

- ADELINA LINTZMAIER PETIZ -

REGULAÇÃO DO CICLO DOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS EM Scopu-
lariopsis brevicaulis. INTERRELAÇÕES COM O METABOLISMO
DO GLUTAMATO.

Tese de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do
Paraná.

TRABALHO ORIENTADO PELA PROF^a. DR^a. DÉA A. FERREIRA DO AMARAL

Aos meus PAIS.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Glaci T. Zancan

Dra. Kazuko Nascimento

Dra. Momoyo Nakano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
1.1 - Materiais.....	18
1.1.1 - Drogas.....	18
1.1.2 - Microorganismos.....	18
1.2 - Métodos.....	19
1.2.1 - Condições de cultivo.....	19
1.2.2 - Meios.....	19
1.2.3 - Curvas de crescimento.....	20
1.2.4 - Preparação do extrato livre de células.....	21
1.2.5 - Medida das atividades enzimáticas.....	21
1.2.5.1 - Citrato sintase (EC 4.1.3.7).....	22
1.2.5.2 - Aconitase (E.C. 4.2.1.3).....	24
1.2.5.3 - Isocitrato desidrogenase NADP dependente (EC 1.1.1. 42).....	25
1.2.5.4 - Isocitrato desidrogenase NAD dependente (E.C. 1.1.1. 41).....	27
1.2.5.5 - Fumarase (E.C. 4.2.1.2).....	28
1.2.5.6 - Malato desidrogenase (E.C. 1. 1.1. 37).....	29
1.2.5.7 - Glutamato desidrogenase NAD dependente (E.C. 1.4.1.2).....	30

1.2.5.8 - Glutamato desidrogenase NADP dependente (E.C. 1.4.1.4)....	32
1.2.5.9 - Aspartato aminotransferase(E. C. 2.6.1.1.).....	33
1.2.6 - Métodos analíticos.....	35
2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
2.1 - Curvas de Crescimento.....	36
2.2 - Determinação das atividades enzimáticas em função da fonte de carbono e do tempo de crescimento.....	38
2.2.1 - Citrato sintase.....	39
2.2.2 - Aconitase.....	41
2.2.3 - Isocitrato desidrogenase NADP dependente.....	42
2.2.4 - Fumarase.....	43
2.2.5 - Malato desidrogenase.....	45
2.2.6 - Glutamato desidrogenase NAD e NADP dependentes.....	47
2.2.7 - Glutamato desidrogenase NADP dependente	48
2.2.8 - Glutamato desidrogenase NAD dependente.	50
2.2.9 - Aspartato aminotransferase.....	52
2.3 - Interrelação entre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o metabolismo do glutamato.....	55
FIGURA 1	61
FIGURA 2	62
FIGURA 3	63
FIGURAS 4, 5 e 6	64
FIGURAS 7, 8 e 9	65
FIGURAS 10, 11 e 12	66
FIGURAS 13, 14 e 15	67
FIGURAS 16, 17 e 18	68
FIGURAS 19, 20 e 21	69
FIGURAS 22, 23 e 24	70
FIGURAS 25, 26 e 27	71
RESUMO.....	72
AGRADECIMENTOS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

INTRODUÇÃO

O ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA ou ciclo de Krebs) é a vida central do metabolismo, tanto em mamíferos, plantas como em microorganismos. Para ele convergem todos os produtos catabólicos obtidos da degradação de nutrientes e dele divergem todas as reações biossintéticas.

Já em 1952, Krebs et al. (42) reconheceram que o ciclo além de ter funções catabólicas ou oxidativas, servia para a síntese do glutamato via alfa ceto glutarato.

Em 1956 Gilvarg e Davis (24) demonstraram que muitos intermediários do ciclo de Krebs funcionavam como precursores obrigatórios de constituintes macromoleculares das células. Um exemplo desta função anabólica seria dado pela transformação do oxalacetato em aspartato. Quando ocorre este tipo de reação a molécula acceptora de acetil-CoA deverá ser regenerada por outra via afim de que as funções energéticas do ciclo não sejam prejudicadas. Desta maneira seria lógico se esperar que quando o ciclo está exercendo as suas duas funções, energética e biossintética, estejam ocorrendo paralelamente às rea-

ções do ciclo de Krebs outras reações auxiliares de reposição, existentes unicamente para manter o nível normal de intermediários afim de que não ocorra uma parada do ciclo. Estas vias auxiliares foram denominadas de vias anapleróticas, por Kornberg (41) em 1965.

Muitos microorganismos, ao contrário dos mamíferos, podem derivar todos os seus constituintes celulares e também toda a energia necessária da oxidação do acetato.

Kornberg e Krebs em 1957 (43) estudando o ciclo dos ácidos tricarbóxicos em microorganismos, verificaram que em Pseudomonas o acetato na forma de acetil CoA se incorporava ao ciclo em dois pontos. No primeiro, o acetato se condensava com o oxalacetato e formava o citrato, o qual era clivado em duas moléculas, o succinato e o glioxilato; este último composto se condensava com uma segunda molécula de acetil CoA formando o malato. À esta sequência de reações deu-se o nome de ciclo do glioxilato. Este ciclo foi estudado em diversos fungos, entre eles o Aspergillus nidulans por Armit et al. (3,4).

A ocorrência deste ciclo de reações em microorganismos, demonstra claramente que o ciclo de Krebs tem dupla função:

a) age como via terminal de oxidação, levando o acetato à combustão total, isto é, age como via catabólica.

b) age fornecendo intermediários do ciclo, a partir de duas moléculas de acetato, produzindo desta maneira, através do ciclo do glioxilato, precursores para o metabolismo celular, isto é, age como uma via anabólica.

Atualmente, costuma-se dividir o ciclo de Krebs em duas partes, dependendo de suas funções anabólicas ou catabólicas.

A primeira parte engloba uma série de reações anabólicas que funcionam na suplementação à célula do α -cetoglutarato, o qual é mobilizado para a biossíntese do glutamato e amino-ácidos derivados deste. A segunda parte refere-se à uma série de reações catabólicas envolvidas na oxidação do esqueleto carbonado do α -cetoglutarato. Para a função anabólica de síntese do glutamato, concorrerão apenas as três primeiras enzimas do ciclo e para a função catabólica concorrerão todas, sem exceção. Desta maneira as três primeiras enzimas do ciclo possuirão dupla função; catabólica e anabólica.

Um dos mais conhecidos efeitos nutricionais a que estão sujeitas as enzimas do ciclo de Krebs, está relacionado ao metabolismo da D-glucose, sendo que este açúcar reprime marcadamente a formação das enzimas do ciclo em células crescidas em meio complexo. Este tipo de repressão está ligado àquele descrito por Magasanik em 1961 (46) e denominado repressão catabólica.

A repressão catabólica é um tipo de mecanismo de controle que resulta quando uma fonte de carbono rapidamente utilizável é fornecida a um organismo, não havendo necessidade de nas alternativas para a produção de energia.

Em 1968 Cox e Hanson (16) fizeram um estudo sobre repressão catabólica especialmente relacionado ao ciclo de Krebs, estudando o comportamento da aconitase frente a este mecanismo regulatório, em Bacillus subtilis 168. Estes auto-

res verificaram a síntese da aconitase neste microorganismo era desreprimida durante o crescimento em meio deficiente em P e N, e que a adição de adenosina às culturas causava uma repressão prolongada e completa da síntese da aconitase. Embora outras duas enzimas do ciclo, a fumarase e a isocitrato desidrogenase não se comportassem de modo idêntico à aconitase a síntese dessas enzimas, seria regulada de maneira semelhante às aquelas enzimas sujeitas a repressão catabólica.

Hanson e Cox (28) estudando o efeito das condições nutricionais sobre a síntese das enzimas do ciclo de Krebs em B. subtilis e B. licheniformis demonstraram que a capacidade de uma única fonte de carbono causar repressão na síntese da aconitase, isocitrato desidrogenase e fumarase aumentava na seguinte ordem: lactato < lactose < glucose < glicerol. Estes dados aparentemente entram em contradição com aqueles de Gray et al (25) para E. Coli; onde a adição de catabólitos da D-glucose, tal como glicerol não reduzem a atividade das enzimas do ciclo de Krebs, como acontece com a D-glucose.

Umbarger (68) e Gray et al. (25) trabalhando com E. coli e Hanson et al. (31) com B. subtilis encontraram que a repressão das enzimas por D-glucose poderia ser parcialmente diminuída quando estes microorganismos cresciam em um meio sintético, que favorecesse a utilização do ciclo para propósitos biossintéticos. Desta maneira o papel do ciclo de Krebs na biossíntese seria totalmente expresso durante o crescimento em meio salino sintético, com D-glucose ou um dos seus catabólitos como fonte de carbono.

Este fato vêm ao encontro daquele observado em 1952

por Krebs, (42), isto é, as três primeiras enzimas do ciclo estariam envolvidas na síntese do glutamato. Embora elas estejam sujeitas à repressão catabólica, esta repressão só será totalmente expressa quando o ciclo não estiver sendo usado para propósitos biossintéticos, no caso, para a síntese do glutamato.

Em 1964 Hanson et al (31) fizeram observações referentes à regulação da síntese das enzimas do T.C.A. em B. subtilis. Estes autores tinham observado que mutantes desta bactéria incapazes de sintetizar a aconitase, não demonstravam uma total capacidade de esporulação. Estudando a regulação da aconitase, isocitrato desidrogenase e malato desidrogenase, observaram que o glutamato reprimia a síntese das enzimas, quando a D-glucose ou o glicerol eram fontes de carbono. Não foi entretanto observado este efeito, quando o lactato ou o acetato eram fornecidos ao meio. Por outro lado a própria D-glucose era repressora da síntese da aconitase.

Em 1967, Hanson e Cox (28), estudaram o efeito de diferentes condições nutricionais sobre a síntese das enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos em B. subtilis, B. licheniformis e E. coli. Utilizando tipos distintos de meios, os autores analisaram o efeito do glutamato sobre a aconitase, isocitrato desidrogenase, fumarase e malato desidrogenase, observando que a presença de hidrolizado de caseína no meio inibia aquelas enzimas. A síntese da aconitase era também reprimida pelos compostos potencialmente capazes de serem convertidos a glutamato, como arginina, prolina e < cetoglutarato. Dos resultados obtidos, os autores postularam que a síntese

das enzimas do ciclo não obedeceria a um controle coordenado, uma vez que o glutamato reprimia significativamente apenas a síntese da aconitase, enquanto que a síntese da fumarase, malato desidrogenase e isocitrato desidrogenase não eram reprimida em tais condições. Postularam que o verdadeiro repressor para a síntese da aconitase seria o glutamato ou o α -cetoglutarato.

Em 1969 Flechtner e Hanson (19), estudaram o efeito do glutamato e do α -cetoglutarato sobre a síntese da citrato sintase em B. subtilis. Estes autores mostraram que da mesma forma que a aconitase, (28,31), esta enzima estava sujeita à uma regulação por "feed-back", quando da adição do glutamato ou α -cetoglutarato ao meio de cultivo. Verificaram ainda que a síntese das enzimas do ciclo de Krebs são reguladas independentemente uma das outras, já que, quando glutamato e a D-glucose eram adicionados ao meio de crescimento, a síntese da aconitase e citrato síntase eram reprimidos drasticamente, enquanto que o nível da fumarase não se alterava. Para comprovação da hipótese de uma possível coordenação da síntese daquelas enzimas foram efetuados experimentos cinéticos que demonstraram que os modelos de repressão e desrepressão de ambas eram semelhantes e diferiam de modo significativo daqueles obtidos para a fumarase e isocitrato desidrogenase.

Em 1970 Fortnagel (21), estudou a regulação da aconitase e da isocitrato desidrogenase em mutantes esporulantes de B. subtilis e verificou que em mutantes bloqueados na síntese da aconitase ou isocitrato desidrogenase, incapazes portanto de sintetizar α -cetoglutarato e conseqüentemente o glutamato, os níveis destas enzimas estavam desreprimidos. Mu-

tantes bloqueados na utilização do α cetoglutarato desidrogenase tinham níveis permanentemente reprimidos para ambas enzimas. O autor sugeriu que o acúmulo de α cetoglutarato ou sua falta, seria fator responsável pela alteração do nível daquelas enzimas. Estes resultados confirmaram a hipótese de que α cetoglutarato ou glutamato funcionariam como corepressores da síntese da aconitase e da isocitrato desidrogenase. Nestes mutantes, e também no tipo selvagem, a adição de glutamato causava repressão das enzimas, devido provavelmente ao aumento da concentração intracelular de α cetoglutarato ou glutamato.

Em 1974 Onhé (50) estudou a repressão por feed-back da aconitase em B. subtilis. Verificou esta repressão, quando da adição do glutamato ao meio de crescimento, confirmando os dados obtidos por outros autores (19,21), segundo os quais a adição de glutamato ao meio levava à repressão tanto da aconitase, quanto da citrato sintase.

Em 1975 Hanson e Tanaka (29), observaram a regulação do T.C.A. em bacilos aeróbicos gram-positivos, verificando que a presença de glutamato, causava um decréscimo na atividade das três primeiras enzimas do ciclo, enquanto que o nível de fumarase não diminuía apreciavelmente. À partir dos dados descritos alguns conceitos sobre a regulação das enzimas do T.C.A. ficaram bem sedimentados.

Todas as condições que influenciam diretamente as atividades das enzimas do ciclo de Krebs, acima descritas, isto é, as diferentes fontes de carbono, e a presença de glutamato ou α cetoglutarato, no meio de cultivo, influenciam também a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo do glutamato

em fungos, no caso as glutamato desidrogenases. A enzima glutamato desidrogenase, (GDH) não se encontra presente em B. subtilis, organismo utilizado para os estudos de regulação até aqui descritos (28,64). Como este microorganismo não possui glutamato desidrogenase, não poderia ocorrer uma interferência da sua atividade na regulação do T.C.A. e, embora, o B. licheniformis possua a glutamato desidrogenase NADP dependente, isto não iria influenciar o comportamento regulatório das enzimas do ciclo, já que, segundo Umbarger (69), a enzima glutamato desidrogenase em bactéria não está sujeita à regulação. Esta enzima cataliza a interconversão de α -cetoglutarato e glutamato, sendo de importância fundamental, devido a posição central ocupada por estes metabólicos no metabolismo e a habilidade destes em participar de muitos tipos de vias. Possibilita também a incorporação de nitrogênio em compostos orgânicos, ligando assim o metabolismo dos amino-ácidos ao dos carboidratos, constituindo-se na principal via metabólica para o aproveitamento de NH_3 . Foi verificado que em fungos ocorrem duas glutamato desidrogenases diferentes, com diferentes características cinéticas. Uma destas enzimas seria dependente do NAD e a outra do NADP e, seria o caso para Penicillium oryzae (39), Neurospora crassa (60), Fusarium oxysporum (63) e Coprinus lagopus (10). Pode-se deduzir que, como estas enzimas estão envolvidas no metabolismo do glutamato e α -cetoglutarato, em fungos, poderiam modificar ou mesmo mascarar os resultados da regulação das enzimas da fase anabólica do ciclo de Krebs.

Tornou-se claro à partir de diversos estudos, (7,17,22, 60,61,63,65,66,67), que a reação catalizada pelas glutamato

desidrogenase tem duas funções fisiológicas diferentes a realizar dentro das células, sendo cada uma destas funções catalizadas por uma enzima diferente. Assim, papéis metabólicos diferentes tem sido dados a estas enzimas. A GDH NADP dependente teria uma função anabólica na célula, concernente com a assimilação do NH_3 , sua função seria a aaminação redutiva do α -cetoglutarato. A GDH NAD dependente, por sua vez teria uma função catabólica estando envolvida na desaminação oxidativa do glutamato.

Foi verificado que sempre existe uma relação inversa entre os níveis das duas enzimas durante o crescimento dos fungos, que seria provavelmente consequência de suas funções metabólicas distintas. Este fato motivou o estudo dos efeitos de diferentes condições nutricionais sobre a síntese destas duas enzimas em fungos. O comportamento regulatório destas enzimas foi estudado em A.niger (22), F.oxysporum (63), C.lagopus (17,66) e N.crassa (7,38,61,65,66). Verificou-se principalmente o efeito da fonte nitrogenada sobre o nível de ambas as enzimas (7,10,18,23,33,34,54,62,64,65). A importante observação de que as glutamato desidrogenases possuíam diferentes funções na célula levaram pesquisadores a testar o efeito do glutamato sobre os níveis destas enzimas. Foi observado que de acordo com suas diferentes funções elas eram reguladas simultaneamente pelo glutamato. Este metabólito reprimia a enzima NADP dependente responsável pela sua síntese e, ao mesmo tempo induzia a enzima NAD dependente, envolvida na sua degradação (61,62,65,66). Deduziu-se daí que estas enzimas eram reguladas reciprocamente e que, metabólitos tal como o glutamato, que aumentam a atividade de uma enzima, redu-

zem concomitantemente o nível da outra (23,54,61,62,65,66). No entanto os dados da literatura, deixam margem à dúvidas quanto ao papel do glutamato, um dos metabólitos responsáveis pela regulação da expressão gênica dessas enzimas (10,23). Atualmente considera-se o glutamato ou precursores nitrogenados (64) como repressor da enzima NADP dependente, demonstrando assim claramente as divergências existentes entre os autores. Os mecanismos regulatórios das duas enzimas em fungos, tornaram-se muito mais interessantes, e complexos, quando foi sustentado por diversos autores, o fato, de que estas enzimas estariam sujeitas a um segundo tipo de regulação, a regulação catabólica (11,17,38,66).

Dos estudos realizados sobre a repressão catabólica, foi aventada a hipótese de que o α cetoglutarato estaria envolvido na regulação das duas enzimas (11,17,20,38,54,65).

Um dos primeiros estudos sobre o comportamento regulatório das glutamato desidrogenase foi efetuado em N. crassa por Sanwal e Lata (61) que estudaram o efeito do glutamato na formação das duas enzimas. Observaram uma grande diminuição na atividade da enzima NAD dependente, quando o glutamato e NH_3 eram adicionados juntos ao meio de crescimento. A partir destes e de outros dados, deduziram que a enzima NAD dependente se encontra reprimida, e que, esta repressão é sobrepujada pela molécula sintetizada à partir do glutamato e NH_3 , sendo a enzima desreprimida nestas condições. A enzima NADP dependente não estaria reprimida normalmente, mas o seria, quando a substância repressora combinava-se com o composto produzido por ambas as fontes de nitrogênio.

Sanwal e Lata (62) e Stewart et al (66), confirmaram as observações feitas anteriormente e levantaram a hipótese de que a substância repressora produzida a partir do glutamato e NH_3 e que exercia o efeito regulatório sobre ambas as enzimas era um composto ativo derivado da uréia ou ainda a própria uréia.

Em 1963 Barrat (7) estudando o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade específica da GDH NADP dependente em N. crassa, mostrou que a síntese desta enzima era influenciada marcadamente pela forma química que o nitrogênio era adicionado ao meio de cultura. Verificou que ocorria uma diminuição na atividade específica da enzima quando a fonte de nitrogênio era o glutamato, mais marcadamente quando esta era uma mistura de glutamato e NH_3 ou caseinato de sódio.

Estes dados diferem, portanto, daqueles descritos por Sanwal e Lata (62) onde a uréia foi considerada a molécula repressora. Assim Barrat conclui que glutamato, ou derivados outros que uréia, estão envolvidos na repressão da enzima, embora considere que os seus resultados não eliminam a hipótese de que a amônia exerça um papel regulatório sobre a enzima NADP dependente, já que este composto em altas concentrações reprime sua síntese.

Em 1967, Stachow e Sanwal (65) estudando a regulação das GDHs por precursores nitrogenados do glutamato em N. crassa confirmaram os dados anteriormente obtidos (62) de que a adição de uréia ao meio de crescimento, resultava na regulação simultânea das duas enzimas. Isto seria devido a existência de uma urease que cinde a uréia em amônio, confirmando que a

regulação das duas enzimas poderia ser efetuada por amônio ou um composto (tal como o glutamato) dela derivado. Os autores observaram que o aumento da concentração de NH_3 no meio de cultivo aumentava a concentração de glutamato dentro da célula até alcançar um "plateau". Um aumento posterior da concentração de amônio no meio de crescimento levava ainda a uma indução na atividade da enzima NAD dependente, o que poderia significar que o amônio, e não glutamato, seria a molécula reguladora para ambas as enzimas.

Em 1969 Pateman estudou a regulação da GDH NADP dependente em A. nidulans (54), verificando que sua atividade era diminuída quando o fungo era crescido em glutamato ou em altas concentrações de uréia ou NH_4 . Foi sugerido que o glutamato sozinho determina a velocidade de síntese da enzima NADP dependente, as demais fontes de nitrogênio agiriam através do nível de glutamato.

Para leveduras foram observados aspectos regulatórios diferentes dos obtidos para N. crassa. Em 1971, Ferguson et al (18) verificaram para Candida utilis que, embora a GDH NAD dependente esteja desreprimida em meio contendo glutamato ou outros amino-ácidos, a adição de amônio ao meio contendo altas concentrações de glutamato, inativava esta enzima. Estes dados mostram que a inativação seria importante para evitar que o "pool" de glutamato fosse exaurido, sendo que isto ajudaria a manter níveis apropriados de glutamato dentro da célula.

A repressão da síntese da enzima NAD dependente por amônio em Saccharomyces, segundo Holzer et al (33,34) signi-

ficaria que esta enzima serve primariamente para desanimar glutamato, e que na presença de excesso de amônio, não haveria necessidades de posterior desanimação acarretando portanto repressão da mesma. A diferença existente neste aspecto entre a N. crassa e leveduras, seria o fato de que a enzima NAD dependente tem seus níveis aumentados quando a N. crassa é crescida em um meio contendo amônio e glutamato, mas é reprimida marcadamente em Saccharomyces nestas condições. A atividade da enzima NADP dependente nestas mesmas condições parece estar reprimida tanto em N. crassa como em levedura (34).

Em 1970 Kapoor e Goover (38), observaram o efeito de catabólitos do meio de cultivo na síntese das duas enzimas em N. crassa. Os autores mostraram que a síntese da enzima NAD dependente era reprimida enquanto a da NADP dependente era induzida, quando ocorria aumento da concentração de sacarose ou D-glucose no meio de crescimento, efeito este observado quando sacarose foi substituída por D-glucose ou frutose no meio de cultivo.

Ainda em 1970, Castro et al (11) fizeram estudos semelhantes em levedura de panificação e verificaram o efeito de fonte de carbono sobre as enzimas. Neste microorganismo altas concentrações de açúcares induzem a enzima dependente de NADP, reprimindo a enzima dependente do NAD.

Em 1972, Thomulka e Moat (67) estudaram a assimilação de amônio em quatro linhagens de S. cerevisiae. Quando a levedura era crescida em um meio completo, ocorreu repressão da enzima NADP dependente, sendo a atividade desreprimida e máxima quando a levedura era crescida em um meio mínimo, onde o amô-

nio serve como única fonte de nitrogênio. Fato semelhante ocorreu com outra enzima envolvida no metabolismo do glutamato, a aspartato aminotransferase. Isto se explicaria porque em meio mínimo a transaminação seria essencial ao crescimento, se a enzima NADP dependente fosse a principal rota para a assimilação do amônio inorgânico. Quanto à enzima NAD dependente esta foi desreprimida quando a levedura foi crescida em um meio completo, onde se usa extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio.

Ainda em 1972, Fawole e Casselton (17) estudaram a influência de diversas fontes de nitrogênio no crescimento e na atividade enzimática das duas glutamato desidrogenases em uma cepa monocariótica (H_9) e em uma cepa dicariótica ($H_9 \times TC$) de C.lagopus. Embora o glutamato ou o ion amônio não regulem diretamente a síntese destas enzimas, ficou demonstrado que a atividade da enzima NAD dependente aumenta durante o crescimento em um meio com glutamato, enquanto que a NADP dependente é marcadamente reprimida. Foi demonstrado ainda, que a atividade da enzima NAD dependente, em extrato livre de células aumenta, enquanto que, a da NADP dependente diminui quando o micélio é transferido de um meio contendo D-glucose e amônio a um meio contendo glutamato. Estes resultados poderiam significar que a presença de glutamato induzia a enzima NAD dependente e reprimia aquela NADP dependente ou, alternativamente, que a presença do amônio reprimia a primeira e induzia a última. Foi mostrado também que houve aumento da atividade específica da enzima NAD dependente, quando a cepa monocariótica era crescida em meio contendo glutamato como única fonte do carbono e nitrogênio.

A hipótese de que o α cetoglutarato seria o efetor da regulação catabólica já tinha sido levantada por Casselton em 1969 (10) e por Flavel e Fincham (20). Estes últimos observaram que mutantes acu-2 de *Neurospora* que não possuem α cetoglutarato desidrogenase, apresentam aumento na atividade da glutamato desidrogenase NAD dependente, sem diminuição na atividade da enzima NADP dependente, sugerindo o envolvimento do cetoglutarato na regulação das duas enzimas.

O efeito da amônia sugerido por Stachow e Sanwal (65) seria indireto, exercido através da remoção do α cetoglutarato.

Estudo sobre a repressão catabólica efetuado em 1974 por Stewart e Moore (66) para *C. lagopus*, confirmaram os dados obtidos por Kapoor e Grover (39) e Casselton (10). A GDH NAD dependente mostrou ser sujeita à repressão catabólica enquanto a NADP dependente à indução, nas mesmas condições. Foi demonstrado que no micélio vegetativo os níveis de ambas as enzimas são influenciados marcadamente, além da concentração, pela natureza da fonte de carbono utilizada. A atividade da enzima NADP dependente foi maior quando o micélio foi crescido em D-glucose, comparado com aquele crescido em acetato, ocorrendo o contrário para a enzima NAD dependente. Estes dados concordam com aqueles encontrados por Flavel e Fincham (20) para *N. crassa*. Segundo os autores a fonte de nitrogênio teria muito menor influência nos níveis de ambas as GDHs. Estes autores consideram que o sistema completo de regulação destas enzimas deve envolver mais de uma espécie molecular, uma podendo ser o α cetoglutarato, um produto do metabolismo de carboidratos e a outra a uréia ou um derivado desta, um produto

do metabolismo do nitrogênio.

Em 1977 foram feitos estudos sobre a regulação das duas GDHs em Coprinus cinereus (1), observando-se a repressão quando o fungo era crescido em acetil glutamato. Quando a uréia foi usada como fonte de nitrogênio observou-se que a enzima NADP dependente era reprimida enquanto que a enzima NAD dependente era desreprimida, indicando uma conexão entre as duas enzimas e o ciclo da uréia. Os resultados sugerem que em condições normais de crescimento o nitrogênio é assimilado na forma de aminoácido, e que as duas enzimas em conjunto com as transaminases permitem a continuação do processo. Além deste complexo modelo de regulação a que estariam sujeitas estas enzimas do metabolismo do glutamato, muitos autores se interessaram sobremaneira com a direção seguida por este metabolismo, já que atualmente se sabe que nele participam além das glutamato desidrogenases, a enzima aspartato aminotransferase.

Papa e al (53), mostraram que a transaminação com o oxalacetato e a desaminação oxidativa do glutamato são operativas em mitocôndria de figado, embora haja predominância da reação de transaminação. Haan et al (26) confirmaram aqueles dados mostrando que 90% do glutamato que desaparece é recuperado como aspartato e que somente 10% é transformado em NH_3 .

Estudos sobre este assunto em reticulócitos de coelho usando-se técnicas isotópicas (59) comprovaram os dados acima descritos.

Foi observado por Charba e Nakata (12) que a oxidação

do glutamato em B. cereus ocorre pela via do T.C.A. já que 80% do L-[U-¹⁴C] glutamato utilizado no experimento, foi oxidado até [¹⁴C] CO₂. Assim, a atividade da malato desidrogenase e da fumarase aumentaram rapidamente com a oxidação do glutamato, sendo que, no tempo em que a velocidade de oxidação do glutamato é máxima a atividade da malato desidrogenase aumenta aproximadamente três vezes. Estes dados entretanto, não nos dão todavia nenhuma idéia sobre a direção da oxidação do glutamato.

Apesar do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e sua regulação terem sido amplamente estudados em organismos procarióticos, poucos dados existem sobre a sua regulação em seres eucarióticos.

Por outro lado o metabolismo da glutamato tem sido investigado em diversos fungos (10,17,32,66). O metabolismo deste aminoácido apresenta estreita correlação com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, uma vez que o produto da desaminação oxidativa do mesmo é um intermediário do ciclo, o α -cetoglutarato.

O presente trabalho visa investigar as interrelações do metabolismo do glutamato com a regulação do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, em um organismo eucariótico o Scopulariopsis brevicaulis.

1 - MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 - Materiais

1.1.1 - Drogas

Etileno diamino tetraacetato, fenazine meta sulfato, ácido málico, ditioeritritol, ácido aspártico, fenil metil sulfonyl fluoreto de Na, NADP, NAD, NADH, NADPH, acetil coA, ácido DL isocitríco, treo-DS (+) ácido isocitríco, malato desidrogenase de coração de porco eram produtos da Sigma Chemical Company, diaforase, glicerina bidestilada, α cetoglutarato, 2,6 diclorofenol indofenol, cloreto de magnésio, sulfato de amônio, cloreto de manganês, ácido L (+) glutâmico eram produtos da Merck Company.

As demais substâncias utilizadas neste trabalho eram produtos proanálise.

1.1.2 - Microorganismo

No presente trabalho foi utilizada uma cepa de um ascomiceto, Scopulariopsis brevicaulis isolada no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná e classificada

pelo Cammonwealth Mycological Institute, Londres. A amostra havia sido anteriormente classificada como Pycnoporus cinna-
barinus (15,32).

1.2 - Métodos

1.2.1 - Condições de cultivo

A cultura de Scopulariopsis brevicaulis foi mantida em ágar Sabourand glucose, repicada mensalmente, armazenada à 4°C. O meio líquido era semelhante ao de Markus (47), suplementado com tiamina HCl 0,5 mg% em substituição ao extrato de levedura, sendo o pH final 6,2. As fontes de carbono e os suplementos, foram esterilizados em vapor fluente separadamente. 300 ml de meio de cultura foram distribuídos em erlenmeyers de 1 litro e autoclavados à 120°C por 20 minutos.

Após a inoculação dos esporos, os frascos eram levados à um agitador rotatório (100 rpm) à 28°C por um período de tempo variável.

Os micélios foram coletados por filtração em gaze e lavados com H₂O destilada, pesados e congelados à -20°C, sendo utilizadas no mesmo dia para preparo dos extratos livres de célula.

1.2.2 - Meios

Para os estudos de regulação foram utilizadas dois tipos de fontes de carbono, a D-glucose 10mM e o acetato 20mM. Estas fontes de carbono eram adicionadas à meios mínimos perfazendo os assim chamados meio glucose e meio acetato. Ambos foram considerados como meios controles no presente estudo.

Estes dois meios fundamentais foram suplementados com α -cetoglutarato ou glutamato, 25mM.

Com este tipo de distribuição obtivemos seis diferentes meios, os quais variavam entre si ou na natureza da fonte de carbono ou na natureza do suplemento adicionado.

- a) meio glucose 10mM (controle)
- b) meio glucose 10mM + α -cetoglutarato 25mM
- c) meio glucose 10mM + glutamato 25mM
- d) meio acetato 20mM (controle)
- e) meio acetato 20mM + α -cetoglutarato 25mM
- f) meio acetato 20mM + glutamato 25mM

Foi também utilizado o meio contendo, glutamato, 25mM, como fonte de carbono e nitrogênio.

1.2.3 - Curvas de crescimento

Para a determinação do crescimento do micélio em função do tempo, 100 ml dos diversos meios foram distribuídos em erlenmeyers de 250 ml. Os Preinoculos foram preparados partindo dos esporos crescidos em meio sólido, que foram inoculados ao meio mínimo contendo glucose ou acetato. Para dispersar os esporos foram utilizados pérolas de vidro. (0,5 ϕ). Após 12 hs de crescimento em um agitador rotatório a 100 rpm, a 28°C, os esporos foram filtrados esterilmente em lâ de vidro e o filtrado homogêneo após padronização da turvação a 680 nm, foi distribuído nos meios com glucose e nos meios com acetato, sendo novamente incubados em um agitador rotatório e temperatura de 28°C.

A tempos que variaram de 36 a 96 hs, quando a fonte de

carbono era a glucose^o e de 48 a 120 hs quando a fonte de carbono era acetato, os micélios foram coletados com intervalos de 12 hs. O crescimento micelial foi avaliado pelo pêso seco obtido por filtração em papel de filtro de peso conhecido e mantidos à 60°C em estufa até peso constante.

1.2.4 - Preparação do extrato livre de células

Os extratos livres de células para os ensaios enzimáticos foram preparados por rompimento mecânico das células congeladas em um grau de porcelana com areia do mar previamente tratada, na proporção de 1:1 (p/p). A extração foi feita com tampão fosfato 50mM pH 7,4 na proporção 1:2 (peso úmido/volume do líquido extrator em ml). A suspensão obtida desta maneira era em seguida submetido a centrifugação em centrífuga refrigerada por 15 minutos à 11.400g. O sobrenadante foi utilizado para a medida das atividades enzimáticas. Devido a presença no extrato bruto, de duas enzimas altamente instáveis, a Isocitrato desidrogenase NADP dependente, e a glutamato desidrogenase NAD dependente, este extrato era após a centrifugação imediatamente dividido em três frações, a duas das quais se acrescentavam protetores, sendo a terceira fração utilizada para os estudos das enzimas estáveis.

1.2.5 - Medida das atividades enzimáticas

Para a determinação das atividades enzimáticas, para cada enzima, foram efetuadas as curvas de influência de concentração proteica sobre a atividade enzimática. Todos os valores foram calculados nas velocidades iniciais, e os dados correspondem à média de no mínimo duas experiências.

Para a determinação do efeito da concentração proteica sobre a atividade enzimática, os micélios foram colhidos em todos os diferentes meios, no final da fase exponencial de crescimento.

Assim, em meio acetato, o micélio foi colhido as 96 horas, em meio acetato + glutamato as 60 horas e acetato + cetoglutarato as 72 horas. Quando o meio era a glucose, glucose + cetoglutarato e glucose + glutamato, os micélios foram colhidos após 60 horas, 60 horas e 48 horas respectivamente, sendo que, quando a fonte de carbono utilizada era o glutamato 25mM, o micélio era colhido após 72 horas de crescimento.

Para os estudos de regulação, o efeito do tempo de crescimento sobre a concentração da enzima foi determinada nos diversos meios. Os tempos de crescimento variavam de 36 a 72 horas em meio glucose e glucose+suplementos e de 48 ou 60 horas a 96 horas em meios acetato e acetato + suplementos, estas diferenças nos intervalos de tempo estão relacionadas com os diferentes tempos de geração do fungo, nos diversos meios. Quando utilizou-se glutamato 25mM como fonte de carbono, os tempos de colheita variaram de 48 a 84 horas. Em todas as determinações foi utilizado o Espectrofotômetro Registrador Beckman DU.

1.2.5.1 - Citrato sintase (EC 4.1.3.7)

Citrato oxalacetato-lyase

A atividade da citrato sintase foi determinada indiretamente pelo método de Ochoa (49), através de ensaio espectrofotométrico, acoplando-se a malato desidrogenase e seguindo-se a redução do NAD à 340nm. Neste método utiliza-se acetil

coA e uma mistura de malato, NAD e malato desidrogenase em substituição ao oxalacetato. O controle para evidencição da ação da citrato sintese, foi feito retirando-se o acetil coA, para a determinação das condições ótimas de ensaio, foram estudados os efeitos do pH, da concentração do substrato e da concentração de enzima sobre a atividade enzimática. As construções de substrato, variaram de 0,02 a 0,3 μ moles de acetil coA ($K_m=24 \mu M$), 0,15 a 2 μ moles de NAD ($K_m=150 \mu M$) e de 1 a 15 μ moles para o malato de potássio ($K_m=0,8mM$).

Para a determinação do pH ótimo foram feitos ensaios variando-se o pH de 7,2 à 8,8, utilizando-se tampão Tris HCl 0,2 M (pH ótimo 8,0 à 8,4).

Foram observados também o efeito da concentração de enzima para cada um dos seis meios utilizados variando-se a concentração de proteínas de 26,5 a 132 μg , de 26,75 a 133,75 μg e de 25 a 75 μg respectivamente em meio glucose + α -cetoglutarato e glucose + glutamato. Estas concentrações foram variadas de 10 a 50 μg , 8,25 a 41,25 μg e 7,5 a 37,5 μg para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e acetato + glutamato respectivamente.

O sistema de incubação utilizado era constituído de 0,28 μ moles de acetil coA, 1,4 μ moles de NAD, 15 μ moles de L malato de potássio, pH 7,0, 10 unidades de malato desidrogenase, 50 μ moles de tampão Tris HCl pH 8,0 e extrato livre de células em concentrações variáveis, em um volume final de 1ml, equilibrado a temperatura ambiente. A reação foi iniciada com a adição de acetil coA, tão logo a reação da malato desidrogenase atingisse o equilíbrio, após cerca de 1 minuto. A ob-

serbância foi medida à 340 nm contra um branco sem acetil coA e sem malato desidrogenase.

Foram realizados contrôles para o substrato endógeno para cada concentração de enzima. A atividade específica foi definida como μ moles de NAD reduzidos por minuto por mg de proteína, nas condições do ensaio.

1.2.5.2 - Aconitase (E.C. 4.2.1.3)

Citrato (isocitrato) hidrolase

A aconitase foi ensaiada segundo o método de Racker (56) baseada na absorção a 240 nm de ácido cis aconítico, absorção esta dependente da dupla ligação existente neste ácido. Para a determinação das condições ótimas de ensaio foram variadas as concentrações de substrato, e verificado o efeito do pH sobre a atividade desta enzima. Para a determinação do efeito da concentração de substrato sobre a atividade enzimática, a concentração do DL isocitrato variou de 0,5 a 16 μ moles e do treo - DS (+) isocitrato de 0,01 a 1,2 μ moles (sendo o último ensaio utilizado para a determinação da especificidade de substrato apresentado pelo aconitase frente à estes dois ácidos. O Km para o DL isocitrato foi de 1mM e para o treo DS (+) isocitrato de 0,05 mM.

Na verificação do efeito do pH foi utilizado o tampão fosfato 50 mM em uma faixa de 6,8 a 8,0 (pH ótimo 7,4).

Foram verificados os efeitos da concentração de enzima nos seis diferentes meios utilizados, sendo a concentração proteica variada de 26,5 a 132,2 μ g, de 60 a 300 μ g e de 70 a 350 μ g para os meios glucose, glucose + (cetoglutarato e glu-

cose + glutamato e de 36,5 a 182,5 μ g, 32,5 a 162,5 μ g e 15,3 a 153 μ g para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e acetato + glutamato respectivamente.

O sistema de incubação para o ensaio da aconitase era constituído de 9 μ moles de ácido DL isocitríco ou 0,8 μ moles de ácido (treo) DS (+) isocitríco, dissolvido em 50 μ moles de tampão fosfato pH 7,4 e extrato livre de células em concentrações variáveis, em um volume final de ml equilibrado a temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de extrato bruto. A absorbância foi medida à 240 nm contra um branco contendo tampão, água e extrato, medindo-se o aparecimento do ácido cis aconítico neste comprimento de onda. Foram feitos controles para o substrato endógeno para cada concentração da enzima usada. A atividade específica foi definida como μ moles de ácido cis - aconítico formados por minuto por mg de proteína.

1.2.5.3 - Isocitrato desidrogenase NADP dependente (EC 1.1.1.42)

Treo - DS - isocitrato: NADP oxido-redutase

A atividade da isocitrato desidrogenase NADP dependente foi medida seguindo-se o desaparecimento da cor azul do 2,6 diclorofenolindofenol à 600 nm, decorrente da redução do mesmo pelo transportador de eletrons fenazina meta sulfato. Este método que usa a fenazina meta sulfato como transportador de eletrons entre o NADPH e o 2,6 diclorofenolindofenol é um método utilizado para extratos crús onde poderia ocorrer a presença da NADPH oxidase e foi descrito por Rokosh et al (58).

Devido à grande instabilidade desta enzima (37,57), em S. brevicaulis, foram feitos vários testes para sua estabilização. Com esta finalidade foram utilizados vários tipos de protetores: glicerol à 20%, sacarose à 40% e ditioeritritol 1mM, albumina de ovo 0,2%, albumina bovina 1% e fenil metil sulfonyl fluoreto de Na 1mM.

Para a adição de protetores o extrato foi diluído 1:2 com tampão fosfato pH 7,4, 50mM, que continha o respectivo protetor, os ensaios enzimáticos foram efetuados como acima descrito em três tempos, 0 hora, 3 hs e 6 hs contados à partir da elaboração do extrato. O melhor sistema estabilizador continha glicerol à 20%. Para a determinação das condições ótimas do ensaio desta enzima foram observados os efeitos da concentração de substrato, da variação de pH e da concentração de enzima sobre a atividade enzimática, além de experiências para a determinação de requerimento de cátions, usando-se 2,5 e 5 μ moles dos seguintes cátions, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CoSO_4$, Cl_2Zn , e $CuCl_2$. Embora o ion Mn^{++} seja também ativador, ele não foi usado nos ensaios por precipitar com o tampão Tris-fosfato. Na determinação dos efeitos da concentração de substrato, esses foram variados na seguinte magnitude: 0,04 μ moles à 1 μ mole para o DL isocitrato, (K_m 0,03 mM), 0,05 à 0,45 μ moles para o NADP, (K_m 0,012mM), 0,05 à 0,3 μ moles de 2,6 diclorofenolindofenol (K_m 0,03 mM), 0,25 à 8 μ moles de $MgCl_2$ (K_m 0,03 mM), e de 0,0045 à 0,06 μ moles para a fenazina meta sulfato (K_m = 3,5 μ M).

O efeito do pH foi observado com o auxílio do tampão Tris-fosfato em duas diferentes concentrações 25 a 50 mM, sen-

do pH variado de 7,6 à 8,6, pH ótimo 8,4 com tampão Tris-fosfato 25 mM. Foram também variadas as concentrações de enzima para cada meio, estas concentrações variaram de 13,25 a 79,5 µg, de 30 à 150 µg e de 33,25 à 199 µg para os meios glucose, glucose + acetoglutarato e glucose + glutamato respectivamente.

Em meio acetato e acetato com suplementos, houve uma variação de 10 a 60 µg, 3,3 a 41,5 µg e 5,3 a 66,5 µg para os meios acetato, acetato + acetoglutarato e acetato + glutamato respectivamente.

O sistema de incubação estabelecido era constituído por 0,3 µmoles de NADP, 0,35 µmoles de 2,6 diclorofenolindofenol, 0,026 µmoles de fenazina metassulfato, 5 µmoles de ácido DL isocítrico, 5 µmoles de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e 7,5 µmoles de tampão Tris fosfato 25 mM pH 8,4 e concentrações variáveis de enzima em um volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada com a adição de extrato bruto com o sistema à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada à 600 nm, contra um branco sem 2,6 diclorofenolindofenol. Foram feitos controles para o substrato endógeno para cada concentração de enzima utilizada. A atividade específica foi definida como µmoles de 2,6 diclorofenol indofenol reduzidos por minuto por mg de proteína.

1.2.5.4 - Isocitrato desidrogenase NAD dependente (E.C. 1.1.1. 41)

Threo-DS-isocitrato: NAD oxido - redutase

A atividade da isocitrato desidrogenase NAD dependente foi medida seguindo-se a redução do NAD à 340 nm, ou a redução de 2,6 diclorofenolindofenol à 600 nm, método acoplado onde a enzima diaforase atua como transportador de eletrons

entre o NADH e o 2,6 diclorofenolindofenol segundo método de Cook et al (14).

Em nenhum dos métodos testados houve detecção de atividade enzimática. Foi descartada a possibilidade de NADH oxidado suficiente para impedir a ação da enzima NAD dependente.

1.2.5.5 - Fumarase (E.C. 4.2.1.2)

L-malato hidrolase

A atividade fumarásica foi determinada seguindo-se a absorção do fumarato, à 240 nm, segundo método descrito por Racker (56).

Na determinação das condições ótimas para a enzima foram efetuados estudos sobre a influência da concentração de substrato, da variação do pH e da concentração de enzima sobre a atividade enzimática. A concentração de L-malato de sódio para esta finalidade foi variada de 3 a 45 μ moles (Km 6,9 mM).

O efeito do pH foi verificado com o auxílio de dois tampões, sendo que o pH variou de 7,4 a 8,0 e de 7,8 a 8,6 respectivamente para os tampões fosfato 50 mM e Tris fosfato 50 mM. (pH ótimo 8,0), com tampão fosfato 50 mM.

As observações sobre o efeito da concentração de enzima foram efetuadas nos diversos meios, sendo variadas estas concentrações de 26,5 a 132,5 μ g, de 60 a 300 μ g de 28,3 μ g a 141,5 μ g em meios glucose, glucose + α -cetoglutarato e glucose + glutamato respectivamente e de 36,5 a 182 μ g, 12,7 a 158,75 e de 38,25 a 191,25 μ g, em meio acetato, acetato + α -cetoglu-

tarato e acetato + glutamato.

O sistema para ensaio enzimático ficou ao final constituído de 15 μ moles de L-malato de sódio pH 7,0, 35 μ moles de tampão Tris fosfato 50 mM pH 8,0 e extrato bruto em concentrações variáveis em um volume final de 1 ml equilibrado à temperatura ambiente. A reação foi iniciada com a adição de extrato livre de células seguindo-se o aparecimento do ácido fumário a 240 nm contra um branco com água, tampão e extrato bruto. Controles foram feitos para o substrato endógeno para cada concentração de enzima usada. A atividade específica foi definida como μ moles de ácido fumárico formados por minuto por mg de proteína.

1.2.5.6 - Malato desidrogenase (E.C. 1.1.1. 37)

L-malato: NAD oxido redutase

A atividade da malato desidrogenase foi medida seguindo-se a redução do NAD à 340 nm, pela oxidação do malato de sódio baseando-se em método descrito por Kitto (40).

A determinação para as condições ótimas para ensaio enzimático envolveram os ensaios sobre o efeito da concentração de substrato, pH e concentração de enzima sobre a atividade enzimática.

As concentrações de substrato variavam de 15 à 300 μ moles para o malato (K_m = 12mM) e de 0,1 à 1,5 μ moles para o NAD (K_m = 0,16mM). Na determinação do pH ótimo foi utilizado o tampão glicina Na OH) 0,1M sendo o pH variado de 9,0 à 10,6 (pH ótimo 10,0).

A variação da concentração da proteína enzimática uti-

lizada para os diferentes meios foi de 2,2 a 27,5 μ g, de 2 a 25 μ g e de 1,4 a 17,5 μ g para os meios glucose, glucose + α -cetoglutarato e glucose + glutamato respectivamente: e para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e acetato + glutamato, estas concentrações variavam de 1,8 à 9,1 μ g, de 0,625 a 6,25 μ g e de 0,75 a 7,5 μ g respectivamente.

O sistema de incubação ficou ao final constituído de 1,35 μ moles de NAD, 200 μ moles de malato de sódio pH 7,0 e 50 μ moles de tampão glicina NaOH pH 10 e extrato livre de células em concentrações variáveis em um volume final de 1,0 ml. A reação foi iniciada pela adição de extrato livre de células após o sistema ter sido equilibrado à temperatura ambiente e a absorbância foi medida à 340 nm contra um branco contendo todos os componentes de ensaio com exceção do NAD. Foram feitos controles para substrato endógeno para cada concentração de enzima usada.

A atividade específica desta enzima foi definida como μ moles de NAD reduzidos por minuto por mg de proteína.

1.2.5.7 - Glutamato desidrogenase NAD dependente (E.C. 1.4.1.2) L-glutamato: NAD oxido redutase

A atividade da enzima glutamato desidrogenase NAD dependente foi detectada no extrato livre de células seguindo-se a oxidação do NADH à 340 nm, baseando-se no método usado por Stachow e Sanwal (65). Devido a grande instabilidade apresentada por esta enzima, foram feitos testes para a sua estabilização semelhantes àqueles feitos para a estabilização da Isocitrato desidrogenase NADP dependente. Foram utilizados

nestes testes os seguintes estabilizadores:

Glicerol 20%, ditioritritol 1mM e EDTA 5mM, glicerol 20% e EDTA 5 mM, EDTA 5 mM, ditioeritritol 1 mM. Estes protetores eram preparados em tampão fosfato 50 mM pH 7,4.

Os ensaios enzimáticos para as diferentes frações foram efetuados em dois tempos, imediatamente após a elaboração do extrato e após 4 horas.

O melhor protetor testado foi a mistura contendo glicerol 20%, ditioeritritol 1 mM e EDTA 5 mM. Todos os testes posteriores para a enzima foram feitos utilizando-se como protetor a mistura acima citada. A atividade da enzima era medida até no máximo 2 horas à partir da obtenção do extrato já estabilizado.

Para a determinação das condições ótimas de ensaio enzimático, foram observados os efeitos da variação do pH e da concentração de enzima sobre a sua atividade enzimática. Na observação do primeiro efeito, foram utilizados os tampões Tris HCl 0,2 M e o tampão fosfato de potássio 50 mM, variando-se o primeiro de 7,8 à 8,9 e o segundo de 6,4 a 8,0 unidade de pH. pH ótimo pH 8,0 com tampão Tris HCl 0,2 M.

Para determinar o efeito da concentração de enzima sobre a atividade enzimática nos diferentes meios, as concentrações de proteína variavam de 23 a 92 μ gs, de 28,5 a 142,5 μ g e de 30 a 150 μ g para os ensaios em meio glucose, glucose + α -cetoglutarato e glucose + glutamato e de 80 à 240 μ g, 33,8 à 405,6 μ g e de 14,8 a 74 μ g para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e acetato + glutamato respectivamente. O sistema de incubação era constituído de 100 μ moles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

0,25 μ moles de NADH, 20 μ moles de α -cetoglutarato pH 7,0, 80 μ moles de tampão Tris HCl 0,2 M pH 8,0 e extrato livre de células em concentrações variáveis em um volume final de 1 ml, equilibrado à temperatura ambiente.

A reação foi iniciada pela adição do extrato livre de células ao sistema de incubação, sendo medida a oxidação do NADH à 340 nm, contra um branco contendo todos os reagentes com exceção do NADH. Foram efetuados controles para o substrato endógeno para cada concentração de enzima utilizada.

A atividade específica desta enzima foi definida como μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína.

1.2.5.8 - Glutamato desidrogenase NADP dependente (E.C. 1.4.1.4)

L-glutamato: NADP oxido redutase

A atividade da glutamato desidrogenase NADP dependente foi medida seguindo-se a oxidação do NADPH à 340 nm, durante a aminação redutiva do α -cetoglutarato baseando-se no método descrito por Sanwal (60).

Na determinação das condições ótimas de ensaio enzimático foram realizados observações sobre o efeito do pH e da concentração proteica sobre a atividade enzimática. Para suas realizações o pH variou de 6,8 a 8,0, utilizando-se o tampão fosfato de potássio 50 mM (pH ótimo 7,6). A concentração de proteína variou de 23 a 138 μ g, de 15 a 90 μ g e de 15 a 75 μ g para os meios glucose, glucose + α -cetoglutarato e glucose + glutamato respectivamente.

Para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e ace-

toto + glutamato esta concentração variou de 40 a 160 μ g, 16,9 a 101,5 μ g, e de 14,8 a 74 μ g respectivamente. Quando a fonte de carbono utilizada foi o glutamato 25 mM a concentração de proteína variou de 117 à 702 μ g.

O sistema de incubação era constituído de 100 μ moles de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 μ moles de α -cetoglutarato pH 7,0 neutralizado com KOH, 0,25 μ moles de NADPH, 20 μ moles de tampão fosfato de potássio pH 7,6, 50 mM e extrato livre de células em concentrações variáveis em um volume final de 1 ml equilibrados à temperatura ambiente. A reação era iniciada pela adição de extrato bruto, sendo medida a diminuição da absorbância decorrente da oxidação do NADPH, contra um branco contendo todos os reagentes com exceção do NADPH. Foram realizados controles para o substrato endógeno para cada concentração de enzima testada.

A atividade específica da enzima foi definida como μ moles de NADPH oxidados por mg de proteína, por minuto.

1.2.5.9 - Aspartato aminotransferase (E.C. 2.6.1.1.)

L-aspartato - 2 oxoglutarato aminotransferase

A atividade desta aminotransferase foi medida indiretamente através ensaio acoplado à malato desidrogenase, seguindo-se a oxidação do NADH à 340 nm, dependente da redução do oxalacetato formado na reação da aspartato aminotransferase. Este método baseou-se no descrito por Boyd (9). Foram realizados controles para o substrato endógeno para cada concentração de enzima, sendo também verificados a interferência da atividade da aspartato aminotransferase pela malato desidrogenase.

Para a determinação das condições ótimas de ensaio enzimático foram efetuados estudos sobre o efeito da concentração de enzima e da variação do pH sobre a atividade enzimática.

A variação do pH foi feita utilizando-se tampão Tris HCl, 0,2 M, em uma faixa que variava de 7,2 a 8,8 e tampão fosfato de potássio 50 mM em uma faixa que variava de 6,4 a 8,0. pH ótimo - pH 8,0 com tampão Tris HCl 0,2 M. As concentrações de enzima nos diversos meios variaram de 13 a 78 μ g, de 15 a 75 μ g e de 15 a 75 μ g para os meios glucose, glucose + α -cetoglutarato, glucose + glutamato.

Quando a fonte de carbono era o acetato as concentrações de proteína variaram de 40 a 200 μ g, de 16,9 a 84,5 μ g e de 26,6 a 133,3 μ g para os meios acetato, acetato + α -cetoglutarato e acetato + glutamato respectivamente. A concentração de proteína era variada de 5,85 a 35,1 μ g em meio glutamato 25mM.

O sistema de incubação continha 20 μ moles de α -cetoglutarato de Na, 40 μ moles de aspartato de sódio pH 7,0, 0,25 μ moles de NADH, 0,5 unidades de malato desidrogenase, 80 μ moles de tampão Tris HCl 0,2 M pH 7,6, e extrato livre de células em concentrações variáveis em um volume final de 1ml. A reação foi iniciada pela adição de extrato bruto e a leitura foi procedida contra um branco contendo todos os reagentes com exceção do NADH, logo após o sistema ter sido equilibrado à temperatura ambiente.

A atividade específica foi definida como sendo os μ moles de NADH oxidados por minuto por mg de proteína.

1.2.6 - Métodos analíticos

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de Lowry et al (44).

O coeficiente de extinção molar para o NADPH e NADH foi considerado como sendo à 340 nm igual à $6,22 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (35) e para o cis aconitato à 240 nm foi considerado como sendo $3,3 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (50). E para o 2,6 diclorofenolindo-fenol à 600 nm foi considerado como sendo $21,8 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (5) e o ϵ para o fumarato foi considerado como sendo à 240 nm $2,4 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (8,50).

As enzimas NADH oxidase e NADPH oxidase foram medidas utilizando-se sistemas que continham 300 μmoles de tampão fosfato pH 7,8, 0,25 μmoles de NADH ou NADPH e extrato livre de células: em um volume final de 1 ml, medindo-se a oxidação destas coenzimas à 340 nm, não ocorrendo oxidação no pH testado ou em pHs mais elevados.

2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 - Curvas de Crescimento

Para a avaliação do crescimento o fungo Scopulariopsis brevicaulis foi crescido no meio contendo acetato 20 mM ou glucose 10 mM como fonte de carbono, sendo também suplementados com α -cetoglutarato ou glutamato à uma concentração final de 25 mM.

As figuras 1, 2 e 3 relacionam o peso seco do micélio em 100 ml de meio, em função do tempo de crescimento. Pode-se observar pelos resultados obtidos à partir da fig. 1 que o crescimento micelial é maior quando a fonte de carbono usada é a glucose em comparação com o que ocorre nas mesmas condições, quando esta fonte é o acetato. Observa-se que, quando o fungo é crescido em meio glucose, obtem-se micélio em quantidades mensuráveis após 36 horas de crescimento, enquanto que o crescimento em meio acetato torna possível somente após 54 horas de crescimento.

A fase exponencial em meio glucose, prolonga-se até as 66 horas, sendo que em meio acetato esta fase é alcançada

após 96 horas.

A figura 2 compara os níveis de crescimento micelial em meios contendo glucose e glucose mais suplementos, utilizando-se o meio glucose como referência. À partir desta figura, que interrelaciona o crescimento nos três diferentes meios pode-se observar que quando o fungo era crescido em meio glucose suplementado com cetoglutarato, o peso seco do micélio não aumentava de modo significativo, o que poderia significar que as células de S.brevicaulis não são permeáveis àquele ceto-ácido (28). Quando se adiciona o glutamato ao meio, a quantidade de micélio aumenta, e o fim da fase exponencial é adiantado em 12 horas, quando comparado ao meio sem suplemento. Este fato é compreendido facilmente já, que se sabe que o glutamato sozinho pode servir como fonte de carbono e energia para diversos microorganismos (7,12,17,38,61,65,66).

A figura 3 mostra o comportamento do fungo quando o acetato é utilizado como fonte de carbono, nesta figura interrelaciona-se o crescimento micelial nos meios acetato e acetato suplementado, considerando-se o crescimento no primeiro meio como referência. Observa-se que um crescimento significativo ocorre somente após 54 horas de cultivo. Esta constatação deve-se aparentemente ao tempo necessário para que haja indução das enzimas do ciclo do glioxilato, segundo Assis e Amaral (6).

Quando ao meio acetato é adicionado cetoglutarato, o crescimento micelial aumenta de modo significativo adiantando-se o fim da fase exponencial por 12 horas. O aumento de crescimento micelial que ocorre nestas condições, não é ob-

servado quando este ceto-ácido é adicionado à um meio glucose. (Fig.2) não existindo aparentemente, em meio acetato, o problema de permeabilidade ao α -cetoglutarato, isto poder-se-ia explicar pelo fato de que, quando o fungo cresce, em acetato, a espessura da parede celular é cerca de três vezes menor que a obtida em meio glucose, conforme observado por Cury e Amaral (14). Isto explicaria também a maior velocidade de crescimento observada quando o glutamato é adicionado ao meio controle.

2.2 - Determinação das atividades enzimáticas em função da fonte de carbono e do tempo de crescimento

No presente estudo procurou-se observar o comportamento regulatório das enzimas do ciclo de Krebs sobre dois aspectos: a) Na repressão catabólica, com a adição de glucose ao meio mínimo de composição definida. b) Na repressão por produto final, à que estariam sujeitas as três primeiras enzimas do ciclo, quando à um meio mínimo contendo glucose se adicionam o glutamato ou α -cetoglutarato. Estes estudos de regulação foram efetuados para algumas enzimas, representativas das fases anabólicas e catabólicas do ciclo, em função do tempo de cultivo. Para os estudos de repressão catabólica, foram comparadas as atividades específicas das enzimas em meio com acetato ou glutamato, com aquelas obtidas em meio com glucose. Para o estudo de regulação por produto final das três primeiras enzimas do ciclo, foram feitas comparações das atividades específicas destas em meio com acetato com aquelas obtidas em meios acetato com suplemento; utilizando-se o primeiro meio como um padrão de referência. O mesmo, esquema foi seguido para os meios glucose e glucose com suplementos.

Para a medida de enzimas da fase catabólica, foram utilizadas as mesmas condições de crescimento daquelas para o estudo das enzimas da fase anabólica do ciclo, de maneira à poder-se comparar a regulação da síntese por produto final à que estariam sujeitas as enzimas anabólicas, e a não ocorrência deste tipo de regulação sobre as enzimas da segunda parte do ciclo.

Para o estudo do mecanismo regulatório a que estariam sujeitas as enzimas do metabolismo do glutamato, a glutamato desidrogenase, e a aspartato aminotransferase, utilizaram-se as mesmas condições de crescimento seguidas para o estudo do comportamento regulatório das enzimas do ciclo Krebs. Isto permitiu interrelacionar o metabolismo do glutamato com os resultados anômalos obtidos na regulação por produto final do ciclo, em S. brevicaulis.

2.2.1 - Citrato sintase

Na figura 4 foram comparadas as atividades específicas da citrato sintase em três fontes de carbono diferentes, a glucose o glutamato e o acetato, e em diferentes tempos de crescimento. Houve diminuição nos níveis desta enzima, em todos os tempos, quando a fonte de carbono foi a glucose, comparando-se ao meio com acetato, embora, como descrito por Gray et al (25) e Hanson et al (31), em B. subtilis, esta repressão seja somente parcial, já que a glucose foi adicionada à um meio mínimo, onde o ciclo podia ser usado para propósitos biossintéticos.

Houve desrepressão do nível da enzima quando a fonte de carbono foi o acetato.

Quando se utiliza glutamato como fonte de carbono, torna-se evidente que este metabólito compara-se à glucose, não sendo este amino-ácido capaz de reprimir totalmente a síntese desta enzima. Provavelmente, para que isso ocorra, ele deve ser adicionado junto à uma fonte de carbono rapidamente metabolizável como observado por Hanson et al em B. subtilis (28, 31). Outra conclusão lógica a que se pode chegar com respeito aos níveis desta enzima em um meio com glutamato, diz respeito ao fato observado por Charba et al para B. cereus (12). Assim como em B. cereus, o glutamato em S. brevicaulis, seria metabolizado em parte pelo ciclo de Krebs, já que o nível de citrato sintase é semelhante aos níveis observados quando a fonte de carbono é a glucose, que é comprovadamente metabolizada por este ciclo. Do estudo da influência do tempo de crescimento sobre os níveis de enzima, procurou-se salientar a regulação por produto final desta, adicionando-se a um meio mínimo com glucose ou com acetato, os suplementos, glutamato e cetoglutarato, como tinha sido proposto para B. subtilis, B. licheniformis e E. coli (28).

Os dados da figura 5 comparam os níveis da citrato sintase nos diferentes tempos, em meios com glucose, glucose com cetoglutarato e glucose com glutamato. Aparentemente a síntese desta enzima anabólica não é influenciada significativamente pela adição destes suplementos no meio mínimo com glucose, distinto do observado nas mesmas condições em organismos procarióticos, onde ocorre grande repressão da enzima, quando o glutamato ou o cetoglutarato são adicionados a meio mínimo com glucose (28,31,50). Ainda relacionando-se a regulação da síntese por produto final, na figura 6 são mostrados

os níveis da citrato sintase nos meios com acetato, e acetato com α -cetoglutarato e com glutamato. Ao contrário do observado para B. subtilis por Hanson et al (28,31), em S. brevicaulis quando o glutamato ou o α -cetoglutarato são adicionados a um meio mínimo contendo acetato, pode-se observar o fenômeno de repressão por produto final, embora esta não seja tão drástica como é para B. subtilis em meio glucose com suplementos.

2.2.2 - Aconitase

Foram estudados os efeitos do tempo de crescimento sobre a atividade da aconitase. Na figura 7 acham-se relacionados os níveis desta enzima quando à um meio mínimo se adicionaram três diferentes fontes de carbono, a glucose, o acetato e o glutamato. Como foi observado para outros microorganismos, a aconitase, assim como as outras enzimas do ciclo de Krebs, está sujeita a repressão catabólica (2,16,19,21,25,28,31,50). Esta repressão é observada em todos os tempos, chegando a ser de 80% quando comparada ao seu nível em meio acetato. Esta repressão foi observada embora a concentração de glucose utilizada fosse baixa (0,18%) e o meio mínimo favoreça a síntese de enzimas anabólicas. Os níveis da aconitase em meio glucose, é até menor que aqueles observados no meio mínimo quando glutamato foi utilizado como fonte de carbono. Este último fato corrobora aquele observado para B. cereus onde o glutamato era em parte metabolizado pelo ciclo de Krebs (12).

O efeito do tempo de crescimento, sobre a atividade enzimática, foi usado para a verificação da regulação da aconitase, utilizando-se para tal fim a adição de glutamato ou α -cetoglutarato aos meios mínimos contendo glucose ou acetato

como fontes de carbono. Na figura 8 onde são comparados os níveis desta enzima nos meios glucose com aqueles obtidos com adição dos suplementos, observa-se que nenhum dos suplementos têm influência sobre a atividade desta enzima, em contradição, como também foi observado para citrato sintase, com os dados obtidos para B. subtilis por Hanson et al (28).

Quando se utilizou o acetato como fonte de carbono, (figura 9) os resultados foram diferentes, daqueles observados em um meio com glucose, podendo-se considerar o aparecimento de um comportamento regulatório, já que ocorreu uma diminuição na síntese da aconitase, quando um meio mínimo com acetato, foi suplementado com α cetoglutarato e com glutamato. A síntese desta enzima, assim como da citrato sintase, neste fungo, poderia em meio acetato, estar sujeita à uma repressão por produto final, ao contrário do encontrado para B. subtilis, (31), e embora, os resultados obtidos não seja tão acentuados quanto aqueles obtidos em microorganismos do gênero Bacilli, quando da adição de suplementos a um meio com glucose (28,31, 50).

2.2.3 - Isocitrato desidrogenase NADP dependente

Na figura 10, pôde-se observar o fenômeno da repressão catabólica, pela comparação de níveis da enzima em três fontes de carbono, glucose, acetato e glutamato. Quando foi utilizada glucose como fonte de carbono, se observou uma grande diminuição na atividade desta enzima, em todos os tempos de crescimento. A maior atividade da isocitrato desidrogenase, se observa quando a fonte de carbono é o acetato. Os níveis da isocitrato desidrogenase em meio glutamato são maiores que os

observados quando o fungo foi crescido em glucose. O fato do glutamato comportar-se como ótima fonte carbono já foi anteriormente observado para as duas primeiras enzimas do ciclo, e mostra que o glutamato é um metabólito oxidado através do ciclo de Krebs, além disso, pode-se compreender os dados com maior facilidade, se considerarmos a reversibilidade da reação catalizada pela enzima (37).

Os estudos sobre a regulação exercida pelo produto final sobre a síntese da enzima, foram efetuados da mesma maneira que para a aconitase e citrato sintase. Na figura 11, onde se comparam os níveis da enzima em meio glucose com aqueles com suplementos, se observa que esta enzima não se encontra sujeita à este tipo de regulação. Na figura 12, se comparam os níveis da mesma em meio acetato, com aqueles observados em meio acetato com suplementos. Ao contrário do observado para as outras duas enzimas que participam das etapas biossintéticas do ciclo, a enzima não está sujeita à regulação por produto final em meio acetato com α -cetoglutarato ou glutamato. Os resultados são completamente anômalos provavelmente por se tratar da enzima NADP dependente que não possui papel preponderante no ciclo embora dele participe (46). Também se observa à partir da mesma figura que no tempo de 48 horas de crescimento, há uma maior atividade de enzima nos meios suplementados. Um outro fato que se observa com esta enzima é que com as fontes de carbono usadas, as suas atividades específicas são as menores observadas para as enzimas do ciclo de Krebs.

2.2.4 - Fumarase

Na figura 13, verifica-se a repressão catabólica da

fumarase, variando os níveis da enzima nas três diferentes fontes de carbono, glucose, acetato e glutamato. As menores atividades foram encontradas em meio glucose, quando comparadas às outras duas fontes de carbono. Um fato que não tinha sido observado com as outras enzimas até aqui estudadas diz respeito ao comportamento da fumarase em meio com glutamato. Com as três enzimas anabólicas do ciclo, em meio glutamato, ocorriam níveis enzimáticos superiores aos obtidos com glucose, mas, sempre inferiores aqueles obtidos em meio acetato. Com a fumarase, enzima da etapa catabólica, em presença de um meio com glutamato, observam-se até as 72 horas níveis enzimáticos superiores aos encontrados com as outras duas fontes de carbono. Este fato poderia ser explicado considerando-se que o glutamato é uma fonte endógena de α -cetoglutarato, e a fumarase, uma enzima envolvida na oxidação deste ceto-ácido. Conforme se observa pelas figuras 14 e 15, a fumarase não apresenta sinais de repressão por produto final mesmo em meio acetato, por não estarem as enzimas da segunda parte do ciclo sujeitas a tal mecanismo regulatório (28,50), já que não participam da síntese de α -cetoglutarato e glutamato. Na figura 14, onde se comparam os níveis da enzima em meio glucose, com aqueles obtidos pela adição de suplementos, observa-se que o glutamato funciona como desrepressor para esta enzima, muito mais intensamente que o α -cetoglutarato, fato devido talvez à um problema de permeação das células ao ceto-ácido (28). A figura 15 mostra o comportamento da fumarase em meio acetato e comparativamente em meio acetato com suplementos. Observa-se que em presença α -cetoglutarato e do glutamato ocorre um aumento da enzima envolvida indiretamente nas suas degra-

dações.

2.2.5 - Malato desidrogenase

A figura 16, onde comparam-se os níveis da malato desidrogenase nos três diferentes meios, acetato, glucose e glutamato, ficou evidente a repressão catabólica da enzima pela glucose. Observa-se também que esta enzima possui mais altos níveis em meio acetato, fato observado para todas as enzimas do ciclo, decorrente da existência do ciclo do glioxilato neste fungo (6) que repõe o malato por ação da malato sintase. Quanto à ação do glutamato como fonte de carbono, assemelha-se ao seu efeito sobre a fumarase (Fig.13). Tanto para esta última enzima como para a malato desidrogenase, o glutamato utilizado como fonte de carbono tem um efeito indutivo, acarretando mesmo uma maior atividade enzimática do que aquela observada em meio acetato. Este fato, além de indicar que o glutamato é metabolizado principalmente via ciclo de Krebs, indica que a malato desidrogenase, uma enzima envolvida na degradação do α -cetoglutarato, poderia ser induzido pelo glutamato, precursor intracelular deste ceto-ácido. Os dados das figuras 17 e 18, onde se comparam os níveis da malato desidrogenase em meios suplementados com aqueles obtidos nos meios controle com acetato ou glucose, foram utilizados como parâmetro de comparação com o comportamento regulatório das enzimas da primeira parte do ciclo, semelhantemente ao que foi proposto para a fumarase. Os suplementos adicionados ao meio, realmente aumentam os níveis de ambas as enzimas, fato esperado para enzimas envolvidas na degradação do α -cetoglutarato. Na figura 17, verifica-se a influência dos suplementos

sobre a atividade da malato desidrogenase, em meio glucose. Verifica-se que o α -cetoglutarato, nestas condições, não tem aparentemente nenhuma influência sobre esta enzima, enquanto que o glutamato aumenta o nível da mesma a partir de 48 horas, sendo este aumento máximo às 72 horas. Estes fatos podem ser explicados, pela diferença de permeabilidade da célula à estes metabólitos, sendo que, o glutamato influenciaria positivamente a malato desidrogenase, pelo fato de ser metabolizado intracelularmente por ação da glutamato desidrogenase dependente do NAD, até α -cetoglutarato, o qual seria degradado pelas enzimas da segunda parte do ciclo. Em sequência aos estudos sobre a malato desidrogenase, foram medidos as atividades desta enzima em meio acetato e acetato suplementado. Os dados da figura 18, mostram a pequena influência do α -cetoglutarato sobre os níveis desta enzima. Aparentemente este ceto-ácido poderia estar sendo utilizado para finalidades outras que a oxidação pelo ciclo de Krebs, tal como, estar sendo aminado por ação da glutamato desidrogenase NADP dependente. O glutamato, sendo fonte de α -cetoglutarato, provocaria um aumento dos níveis da malato desidrogenase, embora como se observa pela comparação entre as figuras 17 e 18 esta influência não seja eficaz quanto aquela observada pela sua adição à um meio glucose. Este fato corrobora com a idéia que o α -cetoglutarato intracelular teria outros destinos além da oxidação pelo ciclo de Krebs. Se compararmos os resultados obtidos para a fumarase e malato desidrogenase, com a adição dos suplementos aos meios glucoses e acetato, poderemos observar grandes semelhanças entre os resultados, isto é entre as figuras 14 e 17 e 15 e 18, mostrando que ambas as enzimas, que desempenham

funções semelhantes no ciclo, estariam sujeitas ao mesmo tipo de comportamento frente à adição dos suplementos utilizados. Ambas tem seus níveis aumentados pela adição de glutamato, independente da fonte de carbono utilizada, embora esta influência seja menor quando o glutamato foi adicionado ao meio acetato, do que quando da sua adição em meio glucose. O α -cetoglutarato intracelular, formado à partir do glutamato poderia estar sendo utilizado pela aspartato aminotransferase, nestas condições. Os fatos acima descritos não ocorreram na mesma proporção quando a fonte de carbono utilizada foi a glucose, sendo que aparentemente, neste meio, o glutamato teria como principal destino o de ser oxidado pelo ciclo de Krebs.

Quando o suplemento utilizado foi o α -cetoglutarato, sua influência foi mínima, independente da fonte de carbono utilizada, sendo que em meio acetato, este suplemento produziu um pequeno aumento até 60 horas, tempo depois do qual, não apresentou nenhum efeito sobre a atividade da malato desidrogenase. Desta maneira, em meio acetato este ceto-ácido poderia ter outros destinos além da sua oxidação pelo ciclo de Krebs, podendo também estar sendo utilizado pela enzima glutamato desidrogenase NADP dependente, na reação de aminação redutiva.

2.2.6 - Glutamato desidrogenase NAD e NADP dependentes

As enzimas glutamato desidrogenase NAD e NADP dependentes, estudadas em vários microorganismos, mostraram estarem sujeitas à um complexo modelo de regulação, grandemente relacionados às suas diferentes funções na célula, anabólica,

efetuada pela enzima dependente do NADP e catabólica efetuada pela dependente do NAD (7,17,38,61,62,65,66).

2.2.7 - Glutamato desidrogenase NADP dependente

Foi observado que a enzima possui maior atividade quando a fonte de carbono é o acetato, quando comparada com aquela apresentada em meio glucose (Fig.19). Estes dados entram em contradição com aqueles expostos por Stewart e Moore para C.lagopus (66), onde a enzima NADP dependente, apresenta baixíssimas atividades em meio acetato, quando comparado à apresentada em meio glucose. Quando o glutamato é a fonte de carbono utilizada, não há síntese significativa de enzima NADP dependente, comprovando o fato observado para outros microorganismos, de que esta enzima, sendo envolvida na síntese do glutamato, tem a sua síntese totalmente reprimida na presença deste amino-ácido, quando o mesmo é a única fonte de carbono existente no meio de cultura (7,38,61,62,65). Pode-se observar pela figura 19, outros aspectos já discutidos para outros microorganismos (61, 63,67), relacionado ao nível da enzima NADP dependente, de acordo com a idade da cultura. Esta enzima é mais ativa no início da fase exponencial, decaindo seus níveis rapidamente com o tempo de cultivo. Sua atividade é maior até 48 horas em meio glucose e até às 60 horas em meio acetato, podendo-se relacionar estas diferenças nos níveis enzimáticos, dependentes da idade da cultura, como uma dependência, da concentração da fonte de carbono no início e final da fase exponencial (11). A enzima NADP dependente tem maiores atividades em meio acetato, quando comparado ao meio glucose, mesmo quando estes meios sejam suplementados com cetogluta-

ou glutamato, como pode ser observado pelas figuras 20 e 21. Quando se comparam os níveis de enzima em meio glucose, com aqueles obtidos pela adição de suplementos, na figura 20, pode-se observar que os níveis relativamente altos desta enzima em meio glucose, não são influenciados pela adição exógena de cetoglutarato, devido à impermeabilidade das células à este metabólito nestas condições. Com a adição de glutamato à um meio mínimo de glucose, ocorre uma diminuição nos níveis da enzima, dependente da já discutida repressão pelo glutamato. Pode ser notado que a repressão é somente parcial, como foi observado para N. crassa (38) e em C. lagopus (17), onde a fonte de carbono interfere com a repressão pelo glutamato, podendo este amino-ácido exercer seu efeito repressivo total somente quando atua como fonte de carbono e energia.

Nota-se ainda, que independente da adição de suplemento ao meio, ou de seu efeito sobre a enzima, esta se encontra em maior nível somente nas fases iniciais de crescimento, diminuindo rapidamente com a idade da cultura. Castro et al (11) correlacionou este fato à concentração de catabólitos no início e final da fase de crescimento, isto é a regulação catabólica.

Quando os níveis da enzima NADP dependente em um meio acetato se comparam aos obtidos em meios suplementados obtém-se a figura 21. Observa-se que os resultados são um tanto diferentes daqueles observados quando a fonte de carbono é a glucose. Esta diferença reside no fato de que a adição de cetoglutarato ao meio acetato, acarretaria uma indução da enzima. Essa indução da enzima NADP dependente, pode ser explica-

da com base no reportado por Casselton (10, 17) de que este ceto-ácido atuaria como o efetor da indução catabólica desta enzima. Estas diferenças observadas em meio glucose e acetato, quando da adição de α -cetoglutarato, corrobora os dados das curvas de crescimento 2 e 3, onde aparece claramente que α -cetoglutarato só é significativamente permeável às células em meio acetato.

Quando se adiciona glutamato à um meio mínimo contendo acetato, ocorreria diminuição nos níveis de enzima NADP dependente, embora não tão drasticamente como o observado quando o glutamato funcionou como fonte de carbono e energia. Este fato já tinha sido observado por Kapoor e Grover (38) e Casselton (17), para C. lagopus, sendo explicado com base na interferência da indução pela fonte de carbono sobre a repressão catabólica ou vice-versa.

2.2.8 - Glutamato desidrogenase NAD dependente

A figura 22 compara os níveis desta enzima em meios acetato, glucose e glutamato. A enzima possui maiores atividades em meio glucose, quando comparadas àquelas obtidas em meio acetato, embora em ambos os meios os níveis enzimáticos sejam muito baixos. Estes dados observados para S. brevicaulis entram em contradição com aqueles observados em C. lagopus por Stewart e Moore (66), onde a enzima NAD dependente possui atividades bem menores em meio glucose, quando comparadas com as do meio acetato. Quando a fonte de carbono é o glutamato, observa-se um grande aumento na atividade desta enzima de degradação, comprovando o fato observado para outros microorganismos de que o glutamato funcionaria como um

indutor para esta enzima (7,17,22,38,61,62,63,65,66). O comportamento da enzima^o NAD dependente frente às duas fontes de carbono é semelhante, mesmo quando à estes dois meios é adicionado o α -cetoglutarato (Fig.23 e 24), sendo que em meios acetato e glucose suplementado com glutamato, estes níveis se equivalem (Fig.24).

O comportamento desta enzima nos meios glucose e glucose mais suplementos, é mostrada na figura 23 onde se compararam os níveis desta enzima nos meios acima citados.

Pode-se observar que o nível da enzima em meio glucose é relativamente baixo, podendo-se relacionar este fato à repressão catabólica desta enzima, mesmo a baixas concentrações usadas desta fonte de carbono.

Com a adição de α -cetoglutarato ao meio não há modificação do comportamento da enzima dependente do NAD, decorrente da não permeabilidade das células à este ceto-ácido em meio glucose. Quando o suplemento adicionado é o glutamato, há uma grande indução no nível da enzima, se verificando que realmente em S. brevicaulis, a enzima NAD dependente é regulada pelo glutamato, ou uma molécula à ele relacionada como foi observado para N. crassa (38) e C. lagopus (17).

Quando é feita análise comparativa entre os níveis desta enzima em meio acetato e acetato mais suplementos, os resultados são geralmente semelhantes aos observados em meio glucose nas mesmas condições.

Observa-se pela figura 24 que a enzima tem baixíssimos níveis em meio acetato, não sendo os mesmos influenciados pela adição de α -cetoglutarato ao meio de cultivo. Estes baixos

níveis estariam relacionados à chamada repressão catabólica desta enzima dependente da fonte de carbono e mais especificamente ao α -cetoglutarato.

Quando o glutamato é adicionado ao meio de cultura vai acarretar a indução da enzima NAD dependente, que se encontrava reprimida em um meio sem glutamato.

Comparando-se as atividades das duas glutamato desidrogenases nos diversos meios, verifica-se que a atividade da enzima NADP dependente é muito maior do que aquela observada para a NAD, tanto em meio acetato ou glucose e quando estes meios são suplementados com α -cetoglutarato. Este comportamento provavelmente é o resultado da regulação catabólica destas enzimas.

A relação entre as atividades destas enzimas se invertem quando à qualquer das fontes de carbono é adicionado o glutamato.

2.2.9 - Aspartato aminotransferase

Foi verificado o nível desta enzima em meios que utilizavam como fonte de carbono, a acetato, a glucose ou o glutamato, comparando-se o seu nível nos três meios. Os resultados se encontram expressos na figura 25. Verifica-se que esta enzima apresenta níveis mais altos em meio glucose, quando comparado ao meio acetato, de maneira semelhante ao observado para a glutamato desidrogenase NAD dependente. Pelas figuras 26 e 27, observa-se que a aspartato aminotransferase possui maiores atividades em meio glucose, independente da adição de suplementos, quando comparado aos níveis em meio acetato nas

mesmas condições. Pode ser verificado em meio acetato e naquele suplementado com α -cetoglutarato, que a atividade da enzima cai rapidamente em função do tempo (Fig.27). A atividade da aspartato aminotransferase em meio onde o glutamato funciona como fonte de carbono e energia, é apenas levemente maior do que aquele conseguido em meio glucose. Foram feitos estudos comparativos dos níveis da enzima em meio glucose e glucose + suplementos, usando-se os níveis em glucose como referência. Observa-se pela figura 26 que os níveis da enzima não são modificados pela adição de α -cetoglutarato ao meio com glucose, provavelmente, dependente do problema de permeabilidade das células à este ceto-ácido. Quando se adiciona glutamato ao meio de cultura o nível da transaminase sofre apenas um leve aumento à partir das 60 horas de crescimento. Deveríamos esperar diferentes resultados neste meio, já que o glutamato pode ser considerado como uma fonte intracelular de α -cetoglutarato, sendo que aumentos significativos no nível desta enzima não ocorrem. Desta maneira o α -cetoglutarato intracelular, formado à partir do glutamato, por ação da enzima NAD dependente, estaria sendo metabolizado por outras vias degradativas deste ceto-ácido, como é o caso do ciclo de Krebs. Estes dados corroboram com a idéia de que, ao contrário do descrito para mitocôndria de fígado de rato, (26,53), aparentemente em S. brevicaulis, o metabolismo do glutamato se faz preferentemente pela desaminação oxidativa, e não pela reação de transaminação. Quando são comparados os níveis desta enzima em meio acetato àqueles obtidos com meio suplementado, obtém-se resultados que podem ser observados na Fig.27. Nesta se verificam dois fatos, não observados em meio com glucose ou

glucose suplementada, nas mesmas condições. A atividade desta enzima em meio acetato e meio acetato + α -cetoglutarato cai rapidamente com o tempo de cultivo, sendo que os níveis da enzima em ambos os meios, são praticamente idênticos. Com a adição do glutamato ao meio mínimo, o nível da aspartato aminotransferase aumenta gradativamente a partir de 60 horas, ao contrário do que ocorreu nos dois meios acima descritos. Este aumento gradativo poderia depender de um aumento na concentração intracelular de α -cetoglutarato, formado por ação da glutamato desidrogenase NAD dependente. A formação deste ceto-ácido poderia ocorrer com a adição de glutamato tanto ao meio glucose como acetato. As figuras 25 e 26 mostram que o aumento nos níveis da enzima é menor quando o glutamato é adicionado ao meio glucose do que em acetato, nas mesmas condições. Destes dados se poderia concluir que, nestas condições, haveria uma maior formação de glutamato endógeno, pela ação da aspartato aminotransferase sobre o α -cetoglutarato formado por ação da desidrogenase NAD dependente.

Corroborando com estes dados, teríamos a ação da enzima degradativas do glutamato, tal como a malato desidrogenase e a fumarase, as quais apresentam maiores níveis em meio glucose + glutamato, do que naquele com acetato + glutamato. Aparentemente naquele meio, o α -cetoglutarato, formado à partir do glutamato seria principalmente oxidado pelas enzimas do ciclo de Krebs, sendo que em meio acetato, ocorreria degradação do ceto-ácido preferentemente pela aspartato aminotransferase.

2.3 - Interrelação entre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e metabolismo do glutamato

Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que as enzimas do ciclo de Krebs estão sujeitas à repressão catabólica no eucariote S. brevicaulis, da mesma maneira como foi observado nos procariotes tal como B. subtilis, B. licheniformis e E. coli (28). A repressão observada no fungo é apenas parcial, já que em todas as experiências, o micélio foi crescido em um meio mínimo, com baixas concentrações de glucose (0,18%). Embora em meio mínimo predomine a atividade das enzimas biossintéticas do ciclo, foi observado que são influenciadas negativamente pela presença desta fonte de carbono no meio mínimo. Os resultados podem ser observados pelas figuras 4,7,10,13 e 16, onde se comparam as atividades das enzimas do ciclo em meio com glucose, com aqueles obtidos em meio acetato e em meio glutamato. Devido ao aumento nos níveis das enzimas o ciclo do glioxilato em um meio acetato, dever-se-ia esperar um aumento na concentração das enzimas do ciclo de Krebs, nas mesmas condições. Nossos resultados confirmam este fato, já que como pode ser observado pelas figuras 4,7,10,13 e 16, o nível das enzimas estudadas, é superior aqueles observados em meio glucose, e independentemente da fonte de carbono usada, a maior atividade do ciclo pertence à enzima malato desidrogenase e a menor à enzima isocitrato desidrogenase NADP dependente, fato semelhante ao observado ao para Sacharomyces cerevisae (55).

Além dos comportamentos já descritos, a repressão catabólica e a indução pelo acetato, Hanson et al em 1964, es-

tudando o B. subtilis, (31), postularam para o ciclo de Krebs um novo tipo de comportamento regulatório, dependente das diferentes funções, catabólicas e anabólicas do mesmo, o qual estaria sujeito à influência do glutamato e do α -cetoglutarato, quando estes suplementos eram adicionados ao meio de cultivo. Os resultados obtidos no presente trabalho, no que se refere à repressão por produto final das enzimas anabólicas do ciclo são completamente discordantes daqueles obtidos para bactérias, mesmo quando aparentemente positivos. Quando a fonte de carbono foi a glucose, não ocorreu repressão por produto final para nenhuma das enzimas anabólicas, com a suplementação ao meio, do glutamato do α -cetoglutarato. Estes resultados podem ser observados nas figuras 5, 8 e 11.

Quando o acetato foi a fonte de carbono, observou-se, ao contrário do exposto por Hanson et al (28,31), o aparecimento da repressão por produto final. Em S. brevicaulis, os resultados mostraram um efeito repressivo parcial na aconitase e citrato sintase, quando o α -cetoglutarato ou o glutamato foram adicionados à um meio mínimo com acetato. Estes resultados podem ser observados pela figura 6 e 9.

A isocitrato desidrogenase NADP dependente, aparentemente não sofreu regulação pela adição de suplementos.

As enzimas citrato sintase e aconitase não estariam sujeitas à repressão por produto final em meio glucose, e aparentemente sofreriam este processo quando a fonte de carbono fosse o acetato. A afirmação feita por Hanson et al (31) de que a regulação catabólica seria aditiva à regulação por produto final, face à necessidade dos dois efetores, glucose

e glutamato, aparentemente não ocorre em S. brevicaulis. Poderia se explicar estas discrepâncias, levando-se em consideração que todos os estudos sobre a regulação por produto final das enzimas anabólicas foram realizadas em organismos procarióticos e portanto em organismos que carecem de uma maior sofisticação organizacional. No presente caso, os resultados foram obtidos em um organismo eucariótico, S. brevicaulis.

Um dos fatores que poderia estar relacionado com as diferenças existentes na regulação do ciclo nos organismos procarióticos e eucarióticos seria a oxidação do glutamato.

Em fungos sabe-se que existem duas glutamato desidrogenases, NAD e NADP dependentes (64). Isto também ocorre no microorganismo em estudo. Verificou-se que as condições nutricionais que influenciavam as atividades anabólicas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também afetavam diretamente a atividade das glutamato desidrogenases NAD e NADP dependentes em S. brevicaulis.

A adição de glutamato ao meio de cultivo, induzia a atividade da enzima degradativa NAD dependente, reprimindo a atividade da enzima biossintética NADP dependente. Isto afetaria o "pool" de glutamato dentro da célula, alterando em consequência a regulação das enzimas do ciclo de Krebs.

Casselton (10) levantou a hipótese, de que a concentração de cetoglutarato também influenciaria diretamente as enzimas NAD e NADP dependentes, em fungos regulando-as também simultaneamente, induzindo aquela dependente do NADP e reprimindo a dependente do NAD, fato que poderia influenciar dire-

tamente as enzimas do ciclo de Krebs. O ceto-ácido poderia ter esta influência porque seria o efector da repressão catabólica à que estariam sujeitas estas enzimas. Este tipo de regulação foi descrito para N. crassa (38) e C. lagopus (17, 66), sendo verificado que as glutamato desidrogenases destes fungos estariam sujeitas à influência da natureza e concentração da fonte de carbono utilizada. Desta maneira, a concentração e a natureza da fonte de carbono, influenciando os níveis desta enzima, influenciaria também os "pool" intracelulares de glutamato ou de α -cetoglutarato e consequentemente o comportamento regulatório das enzimas do ciclo de Krebs.

Assim seria possível que para S. brevicaulis nas condições nutricionais usadas no presente caso, fossem passíveis de influenciar o "pool" intracelular de glutamato e α -cetoglutarato.

Em B. subtilis, microorganismos usado nos estudos sobre a regulação das enzimas do ciclo, não existe a enzima glutamato desidrogenase (64), não ocorrendo desta maneira, influência naqueles "pools" intracelulares de glutamato ou α -cetoglutarato, ao contrário do que ocorreria em S. brevicaulis. Em B. licheniformis (28), observa-se a presença da enzima dependente do NADP, embora este fato não deva influenciar o "pool" intracelular destes metabólitos, como no caso de fungos, já que segundo Umbarger (69) as glutamato desidrogenases de bactérias não estariam sujeitas à regulação.

Foi verificada que em S. brevicaulis, ao contrário do descrito para B. subtilis (28,31), em meio glucose com glutamato, quando ocorreria alta concentração intracelular de

Acetogluturato, não se observa nenhum fenômeno repressivo sobre as enzimas anabólicas. O único efeito observado seria a indução de todas as enzimas estudadas, preferencialmente as enzimas degradativas fumarase e malato desidrogenase.

Pelos dados da figura 22 vê-se que em meio glutamato há uma total indução da enzima glutamato desidrogenase NAD dependente e total repressão daquela desidrogenase dependente do NADP (Fig. 19). Este efeito regulatório sobre as duas enzimas, acarretaria por ação da enzima de degradação do glutamato, um aumento do acetogluturato intracelular, o qual obviamente não seria aminado por sua enzima biossintética, já que esta enzima, é praticamente inexistente nestas condições. Nem ao menos, estaria sendo transaminado, já que a transaminase em meio glutamato apresenta níveis comparáveis aqueles obtidos em meios glucose e acetato (Fig. 25). Naturalmente se em S. brevicaulis o acetogluturato apresentasse aquele efeito repressivo descrito para B. subtilis, em meio glutamato, onde existiria alta concentração intracelular daqueles ceto-ácido, dever-se-ia observar a total repressão das enzimas anabólicas do ciclo. Como pode ser observado pelas figuras 4, 7 e 10 tal fato não ocorre, ao contrário há até mesmo um aumento, nestas condições, no nível das enzimas anabólicas quando comparados aos níveis enzimáticos obtidos em meio glucose.

Assim a isocitrato desidrogenase, NADP dependente apresenta um aumento de até três vezes no seu nível. Quanto às enzimas fumarase e malato desidrogenase, o nível destas, em meio glutamato, é superior aos níveis obtidos em meio acetato (Figs. 13 e 16). Esta indução de todas as enzimas do ciclo, sugere

que o ceto-ácido formado poderia, independente da enzima considerada, ser o ativador da velocidade do ciclo de Krebs, não tendo para S. brevicaulis o papel repressivo descrito para bactérias. Esta função repressiva, neste microorganismo, aparentemente estaria relacionado apenas os níveis intracelulares do glutamato. No entanto, para esclarecer definitivamente esta hipótese, seria necessário avaliar o "pool" intracelular de glutamato e α -cetoglutarato nas condições estudadas.

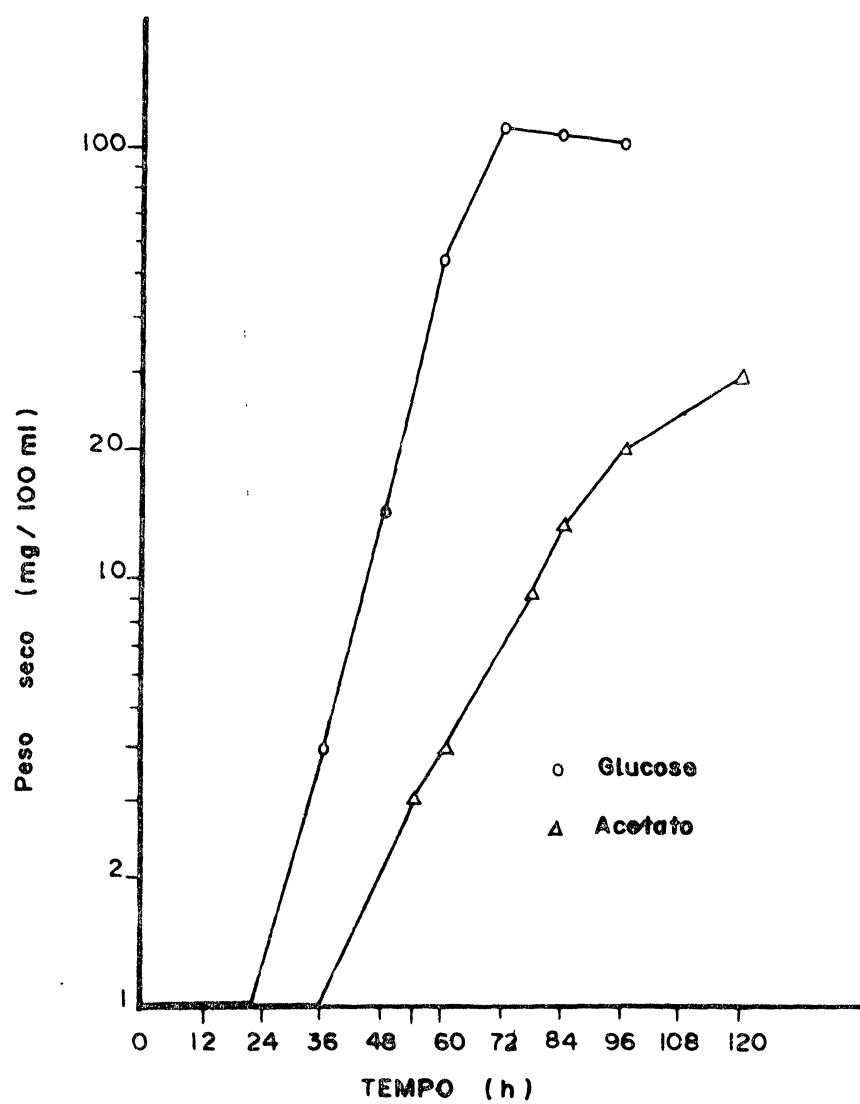


FIG.1 Crescimento do *Scopulariopsis brevicaulis* em função do tempo, em meio mínimo contendo glucose 10 mM ou acetato 20 mM.

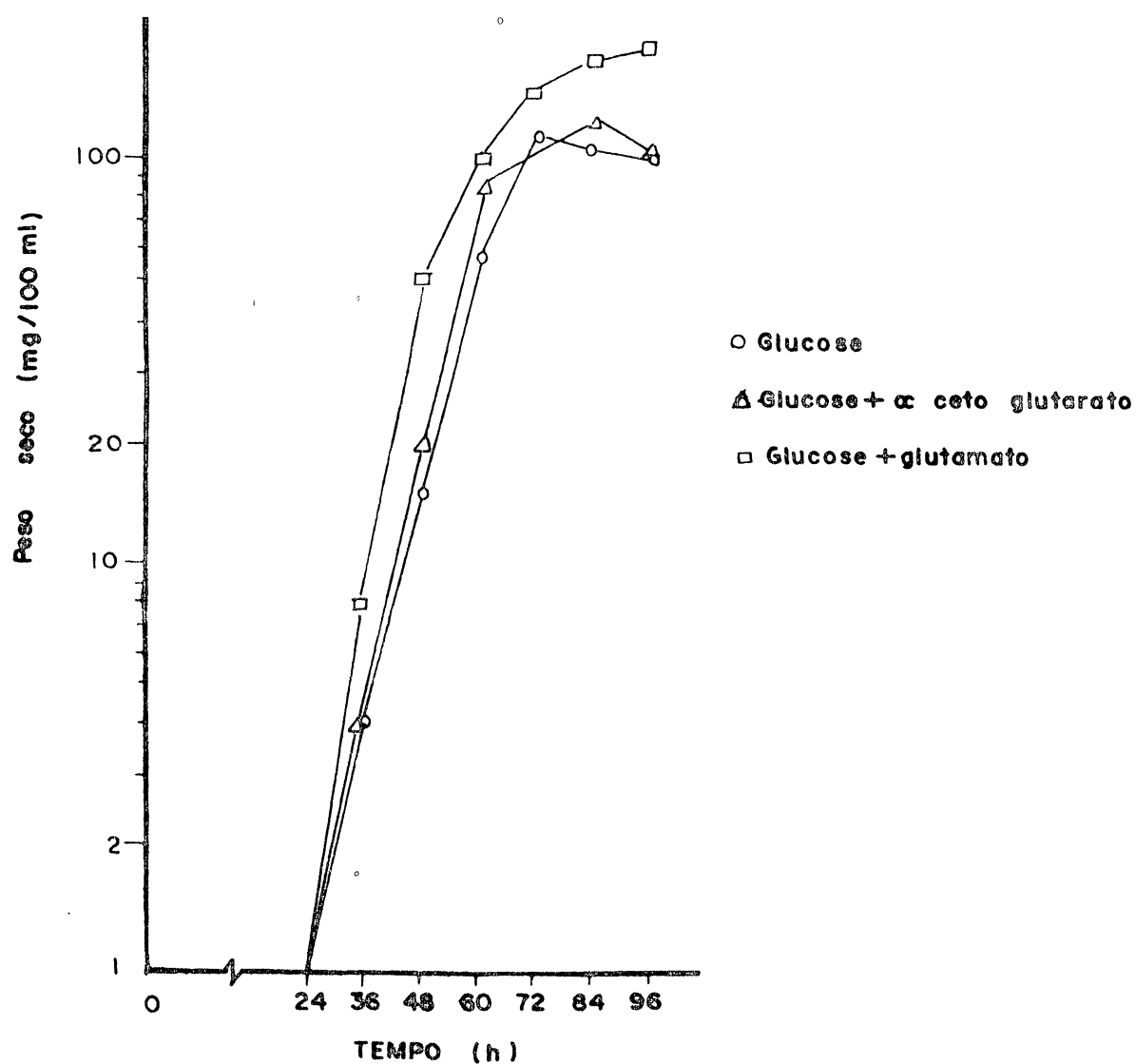


FIG 2 — Crescimento do *Scopulariopsis brevicaulis* em função do tempo em meio mínimo contendo glucose 10 mM, glucose 10 mM + α ceto glutarato 25mM ou glucose 10 mM + glutamato 25 mM

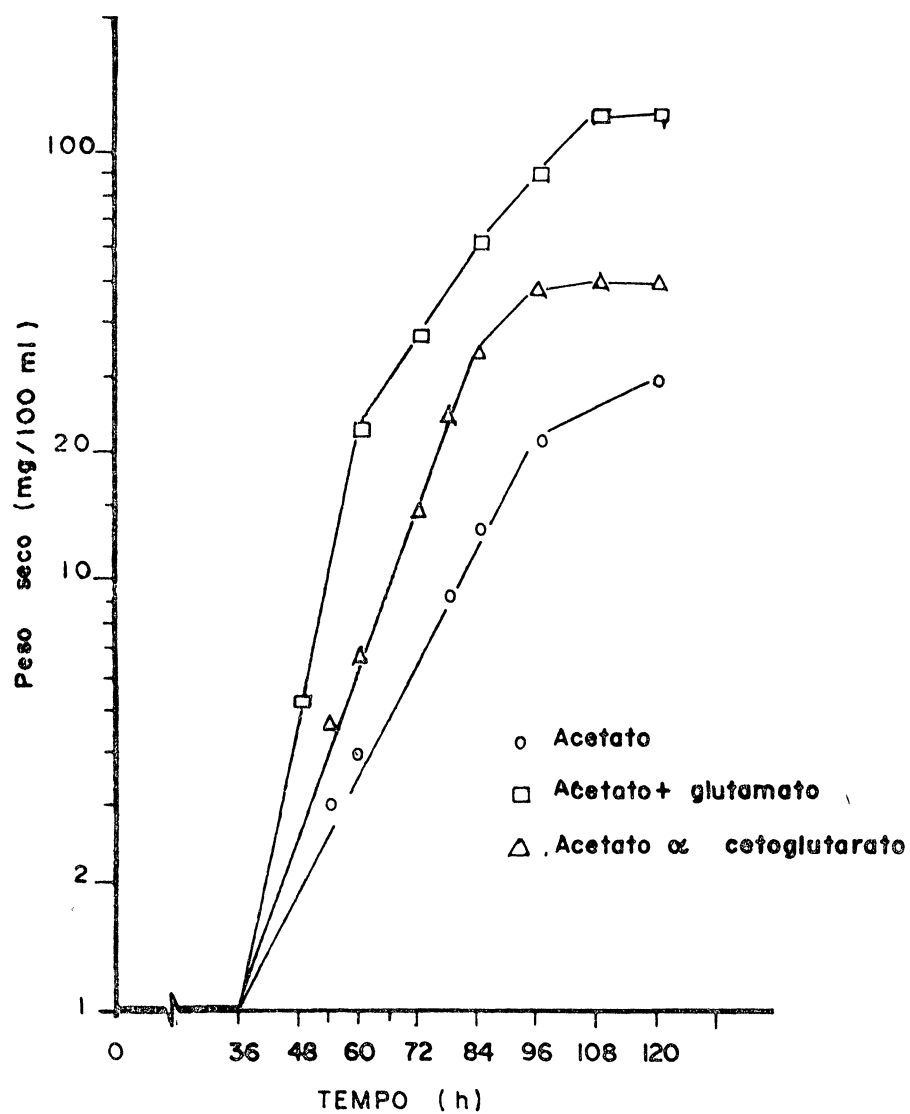
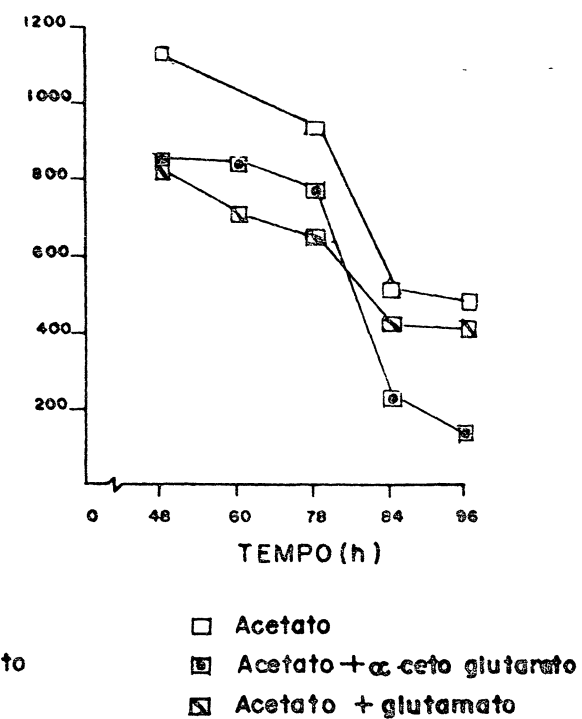
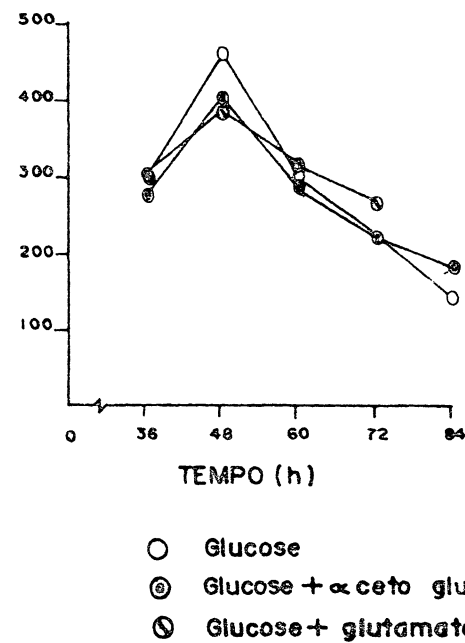
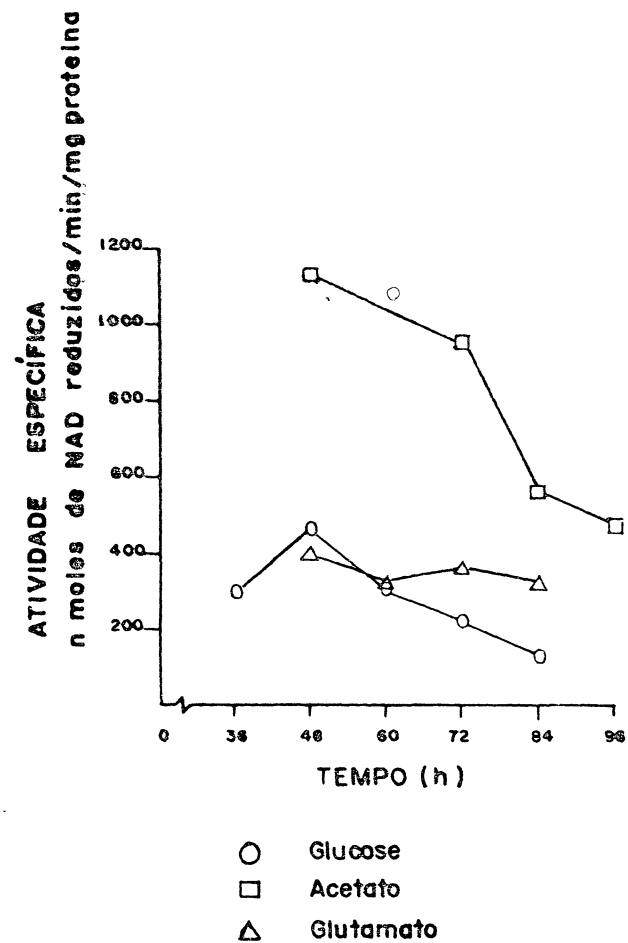
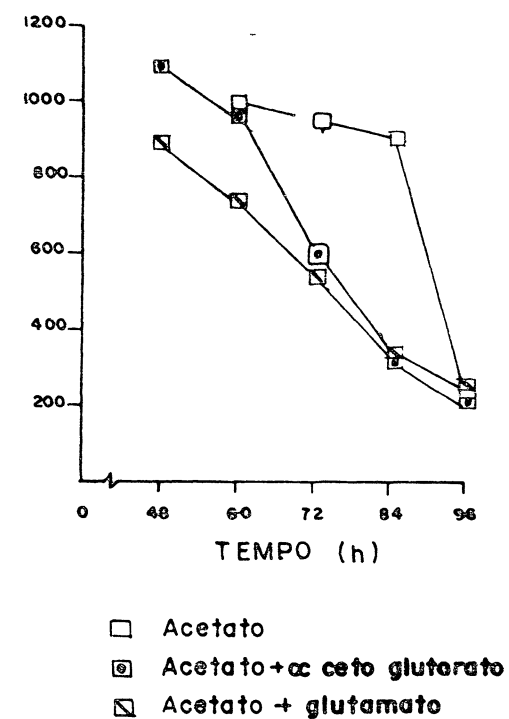
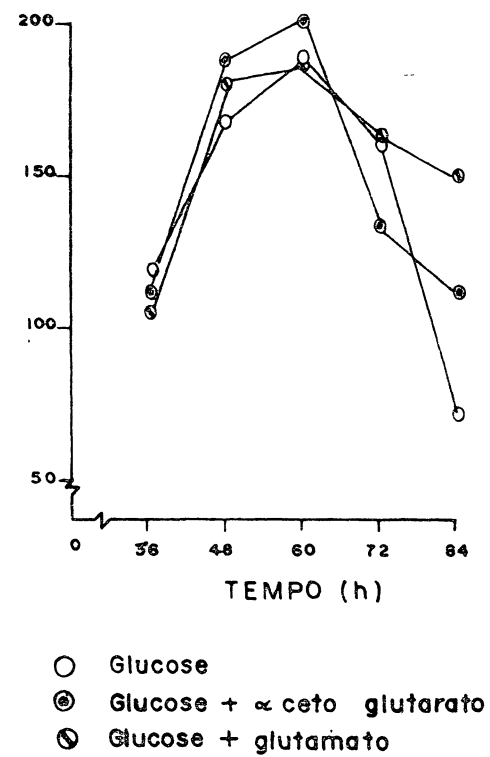
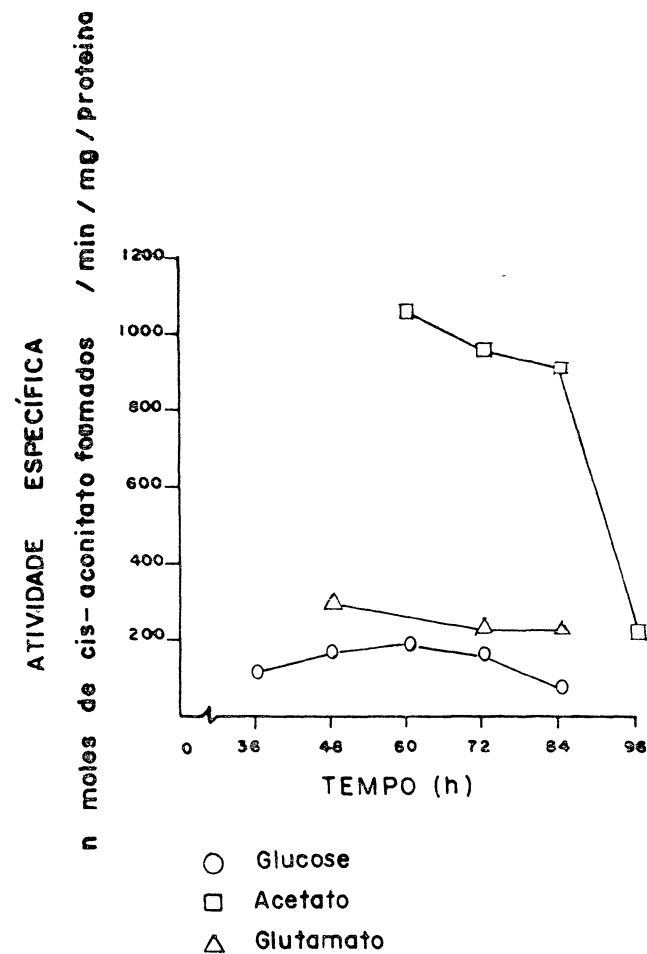


FIG. 3 Crescimento do *Scopulariopsis brevicaulis* em função do tempo, em meio mínimo contendo acetato 20 mM, acetato 20 mM + α cetoglutarato acetato 20 mM + glutamato 25 mM.

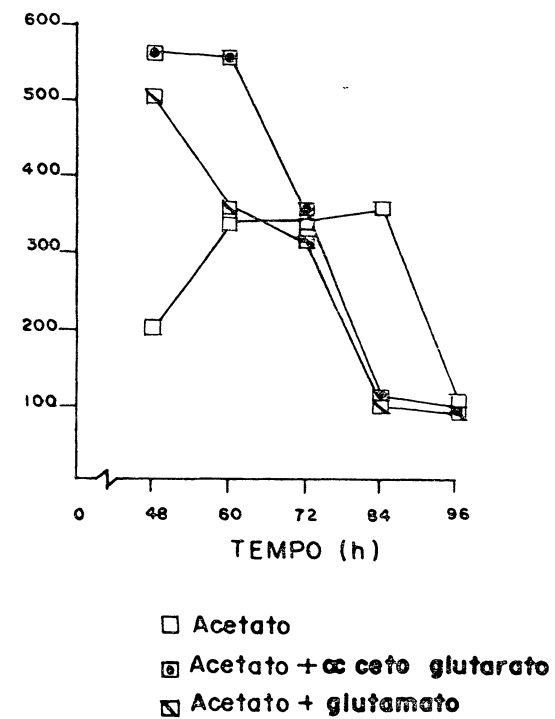
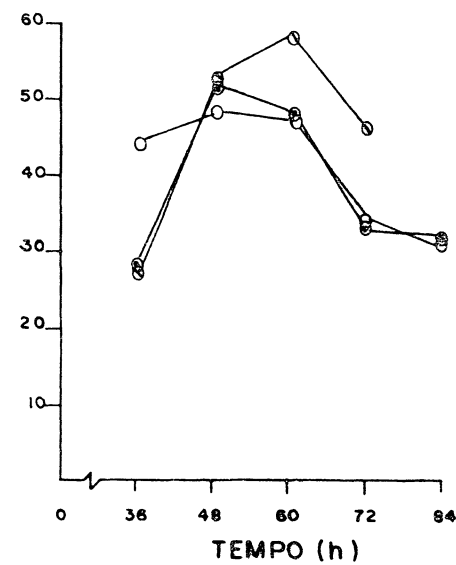
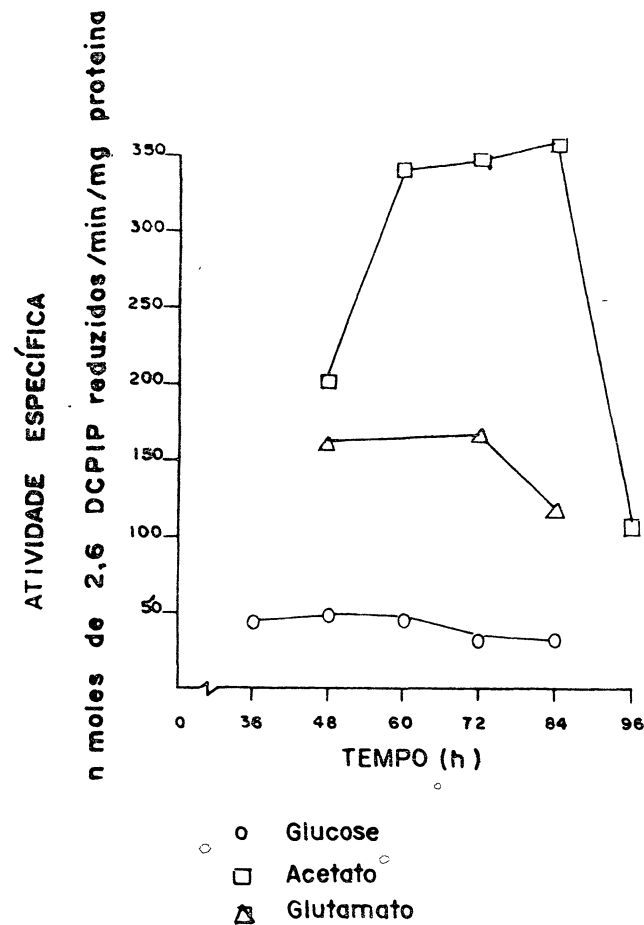


Figs. 4, 5 e 6 — Determinação da atividade enzimática da citrato síntese em função do tempo de cultivo



FIGS:

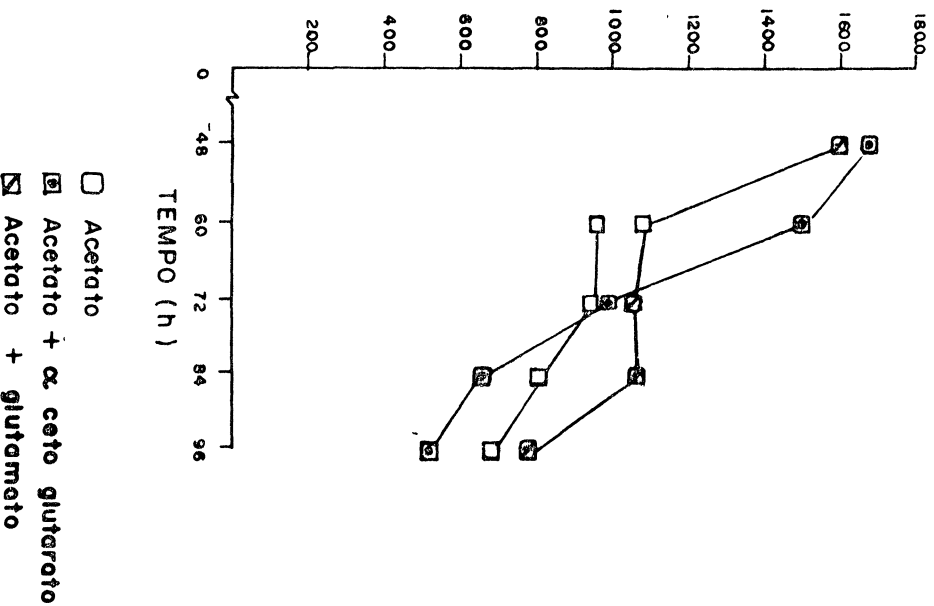
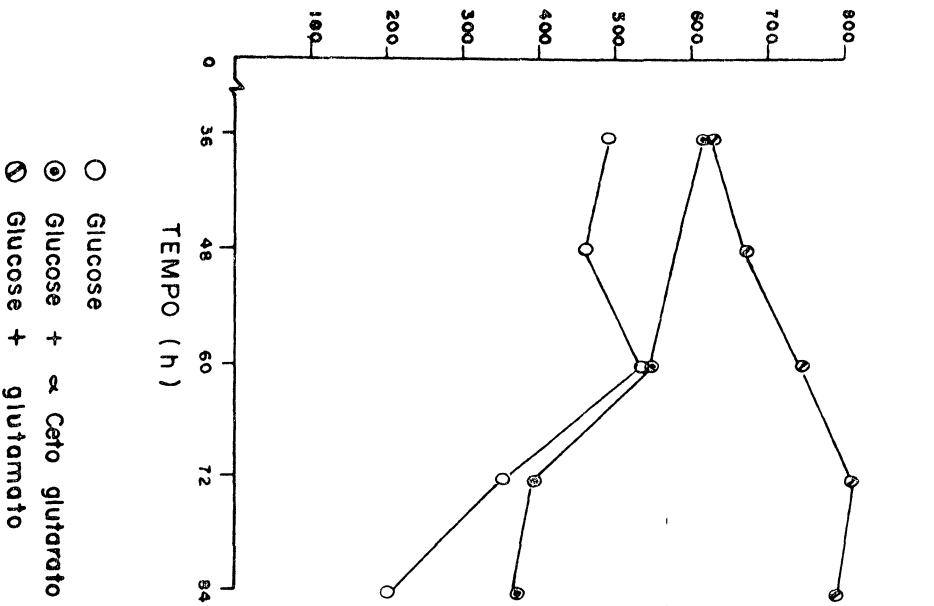
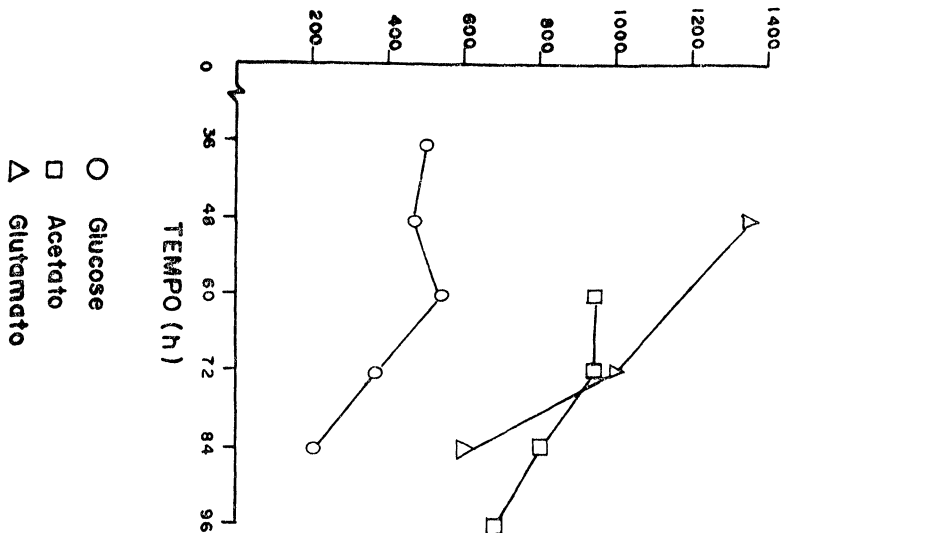
7, 8 e 9 — Determinação da atividade enzimática da aconitase em função do tempo de cultivo



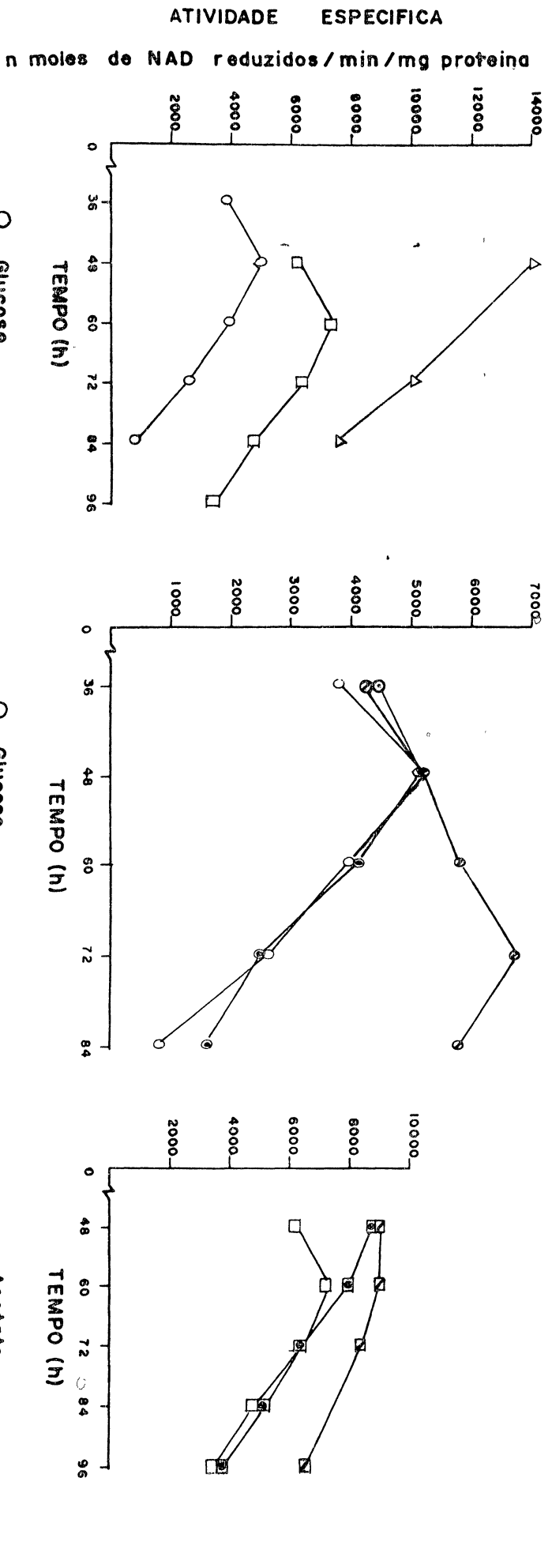
FIGs

10,11 e 12 — Determinação da atividade enzimática da isocitrato desidrogenase. NADP dependente em função do tempo de cultivo

ATIVIDADE ESPECÍFICA
n moles de fumarato formados /min /mg de proteína

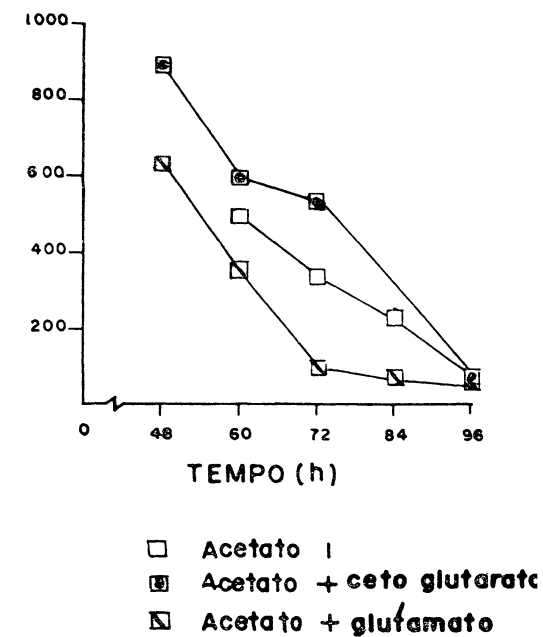
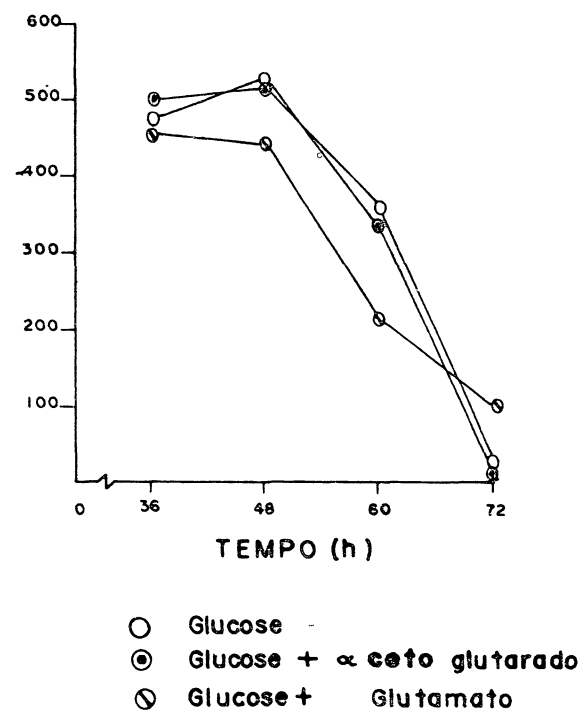
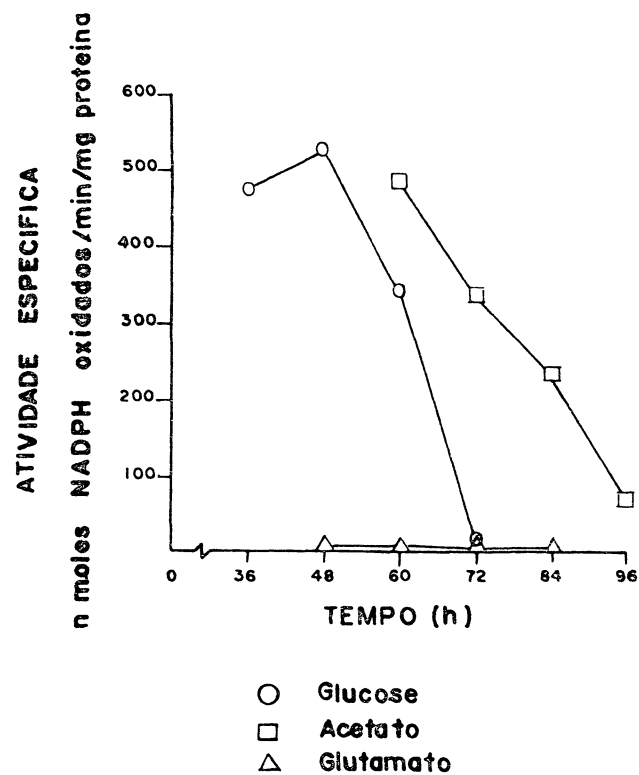


FIGS 13, 14 e 15 — Determinação da atividade enzimática da fumarase em função do tempo de cultivo



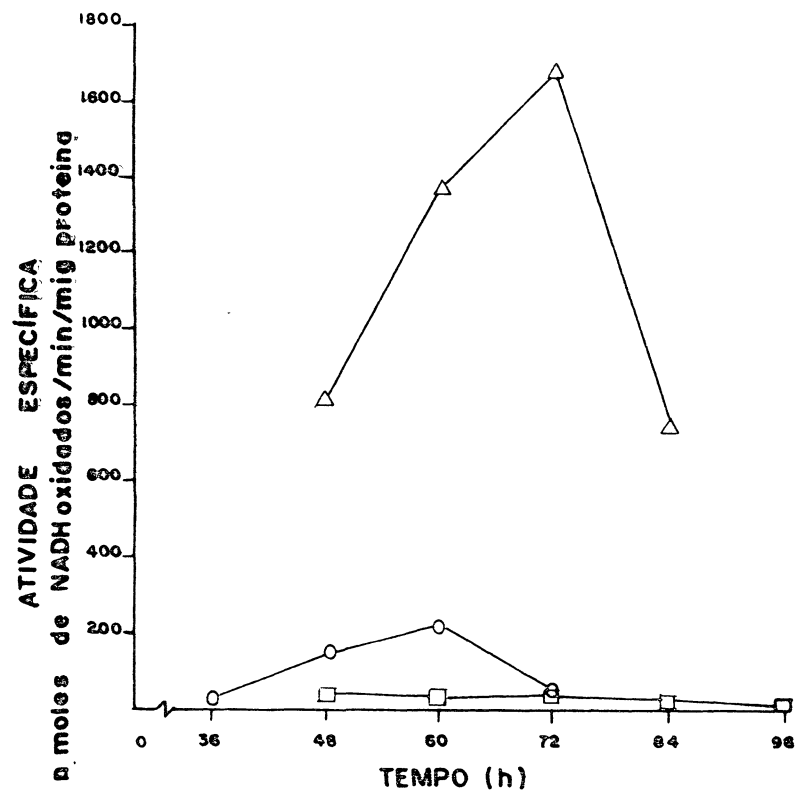
FIGS:

16, 17 e 18 — Determinação da atividade enzimática da malato desidrogenase em função do tempo de cultivo

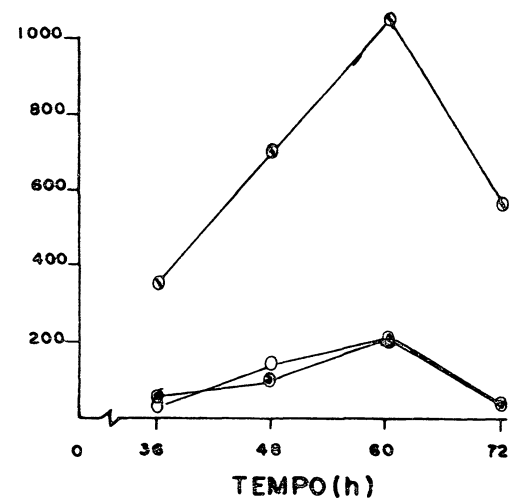


FIGs

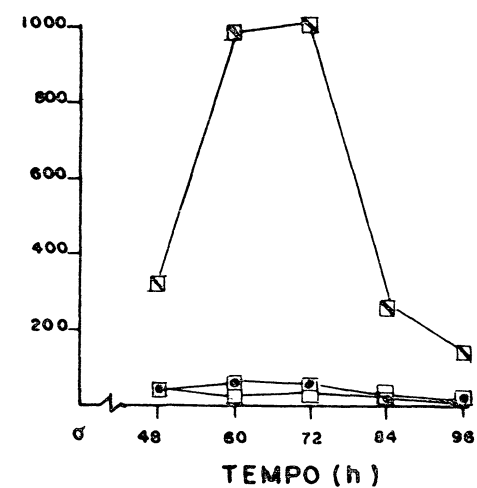
19,20 e 21— Determinação da atividade enzimática da glutamato desidrogenase NADP dependente em função do tempo de cultivo



- Glucose
- Acetato
- Glutamato



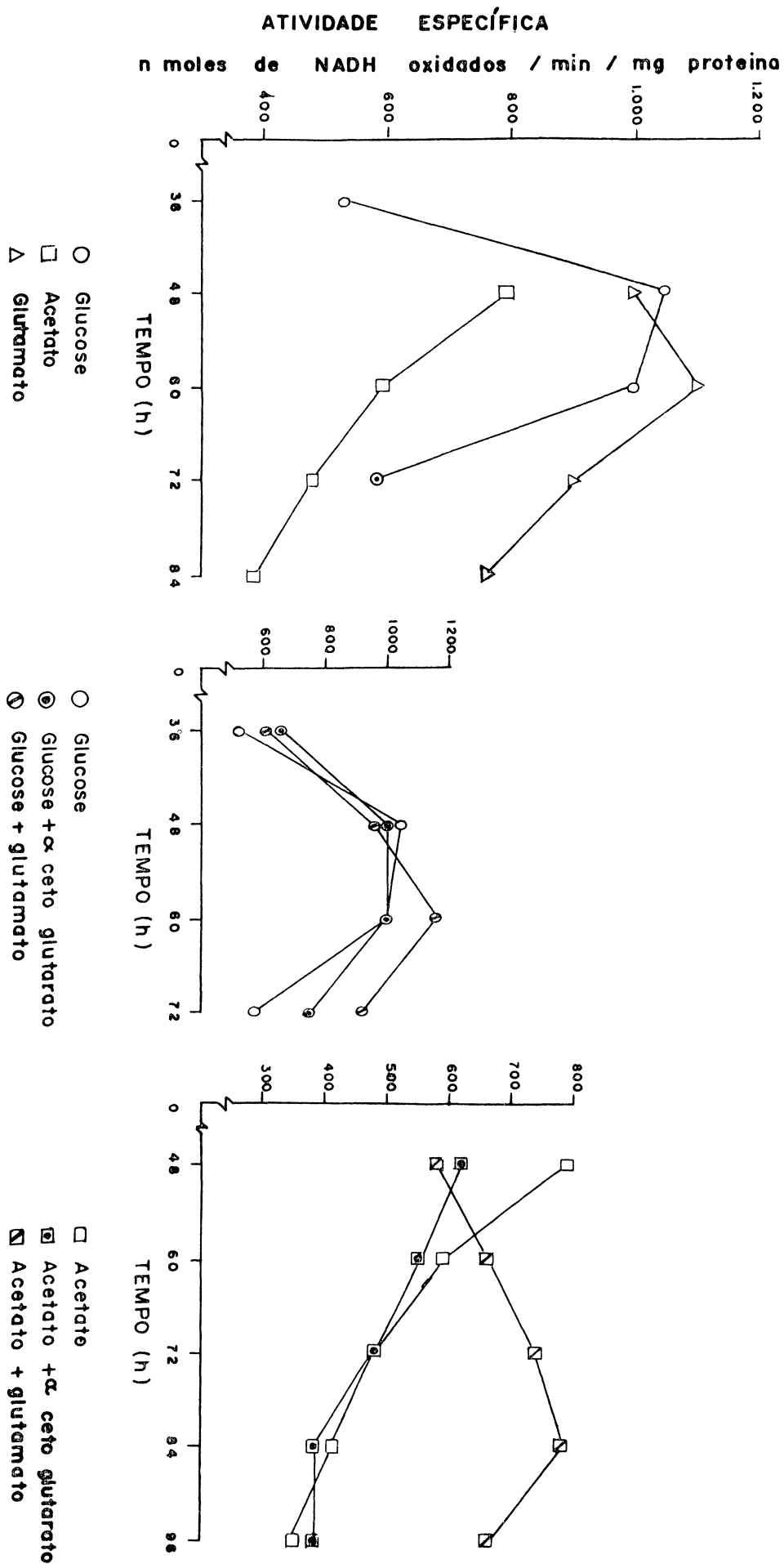
- Glucose
- ⊙ Glucose + α ceto glutarato
- ⊙ Glucose + glutamato



- Acetato
- ⊠ Acetato + ceto glutarato
- ⊠ Acetato + glutamato

Fls

22,23e 24— Determinação da atividade enzimática da glutamato desidrogenase NAD dependente em função do tempo de cultivo



Figs:

25,26 e 27 Determinação da atividade enzimática da aspartato aminotransferase em função do tempo de cultivo

RESUMO

As enzimas do ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos de S. brevicaulis, representativas das fases anabólica e catabólica do mesmo, estão sujeitas à repressão catabólica pela glucose.

As enzimas da fase anabólica do ciclo, no fungo crescido em glucose suplementada com cetoglutarato ou glutamato, não apresentaram repressão por produto final.

A aparente regulação observada quando o fungo cresceu em um meio acetato suplementado com glutamato ou cetoglutarato poderia estar relacionado à uma ação oposta exercida pelas enzimas do metabolismo do glutamato, presentes no fungo.

A metabolização do glutamato pela enzima NAD dependente, impediria a elevação dos níveis intracelulares deste amino-ácido, o que seria responsável pela falta de regulação da aconitase e citrato sintase.

Em S. brevicaulis o cetoglutarato parece não exercer efeito repressivo sobre as enzimas da fase anabólica do ciclo.

O glutamato, em S. brevicaulis, parece ser o metabó-

lito responsável pela repressão da citrato sintase e aconitase quando crescido em meio contendo acetato e suplementos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Déa Ferreira do Amaral pela orientação e apoio durante a elaboração da tese.

À Dra. Glaci T. Zancan pelo incentivo e colaboração durante o trabalho da tese.

À todos os amigos dos Departamentos de Bioquímica das Universidades Federais do Paraná e de Pelotas, que de uma forma ou de outra colaboraram para que fosse possível a realização deste trabalho.

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela ajuda financeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-GHARAWI, A. & D. MOORE. Factors affecting the amount and the activity of the glutamate dehydrogenases of Coprinus cinereus. Biochimica Biophysica Acta., 496: 95-102, 1977.
2. AMARASINGHAN, C.R. & B.D. DAVIS. Regulation of cegoglutarate dehydrogenase Formation in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 240; (9): 3664-3668, 1965.
3. ARMITT, S.; C.F. ROBERTS, H.L. KORNBERG. The role of isocitrate lyase in Aspergillus nidulans. FEBS Lett, 7(3): 231-234, 1970.
4. ARMITT, S.; C.F. ROBERTS, H.L. KORNBERG. Mutants of Aspergillus nidulans lacking malate synthase. FEBS Lett, 12, (5): 276-278, 1971.
5. ARMSTRONG, J. M. The molar extinction of 2,6 diclorophenol indophenol. Biochim. Biophys. Acta., 86: 194-197, 1964.
6. ASSIS, J.S. & D. AMARAL. Study on the glyoxylic cycle in the Basidiomycete Picnoporus cinnabarinus. Arq. Biol. Tecnol., 19: 43-48, 1976.
7. BARRAT, R.W. Effect of Environmental conditions on the NADP-Specific Glutamic Acid Dehydrogenase in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol., 33: 33-42, 1963.

8. BACK, R.M. & R.A. ALBERTY. Studies on the enzyme Fumarase. Kinetic and equilibrium. J. Am. Chem. Soc., 75: 1921-1925, 1953.
9. BOYD, J.W. The extraction and purification of two isoenzymes of L - aspartate: 2 oxoglutarate aminotransferase. Biochim. Biophys. Acta., 113: 302-311, 1966.
10. CASSELTON, P.J. Concurrent regulation of two enzymes in fungi. Sci. Prog., Oxf., 57: 207-227, 1969.
11. CASTRO, I.N., M. UGARTE, A. CANO, & F. MAYOR. Effect of Glucose, Galactose, and Different Nitrogen-Sources on the Activity of Yest Glutamate Dehydrogenase (NAD and NADP-Linked) form Normal Strain and Impaired Respiration Mutant. Eur. J. Biochem., 16: 567-570, 1970.
12. CHARBA, J.F. & H.M. NAKATA. Role of glutamate in Sporegenesis of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 130: 242-248, 1977.
13. CHARLES, A.M. Properties of an NADP specific isocitric dehydrogenase from Thiobacillus novellus. Can. J. Biochem., 48: 95-103, 1969.
14. COOK, R.A. & E.D. SANWAL. Isocitrate Dehydrogenase (NAD Specific) from Neurospora crassa. In: Meths Enzymol., V.13, New York, Academic., 42-47, 1969.
15. CURY, J.A. & AMARAL, D. Carbon Sources dependent Differences in the composition of the cell walls of the Basidiomycete Picnoporus cinnabarinus. Can. J. Microbiol., 23: 1313-1317, 1977
16. COX, D.P. & R.S. HANSON. Catabolic Repression of Aconitase in Bacillus subtilis. Biochim. Biophys. Acta., 158: 36-44, 1968.
17. FAWOLE, M.O. & P.J. CASSELTON. Observations on the Regulation of Glutamate Dehydrogenase Activity in Coprinus lagopus. J.Experimental Botany., 23: 550-551, 1972.

18. FERGUSON, A.R. & SIMS, A.P. Inactivation in vivo of Glutamine Synthetase and NAD-Specific Glutamate Dehydrogenase: Its Role in the Regulation of Glutamine Synthesis in Yeasts. J. Gen. Microbiol., 69: 423-427, 1971.
19. FLECHTNER, V.R. & R.S. HANSON. Coarse and Fine Control of Citrate Synthase from Bacillus subtilis. Biochim. Biophys. Acta., 184: 252-262, 1969.
20. FLAVELL, R.B. & J.R.S. FINCHAM. Acetate-non utilizing mutants of Neurospora crassa. II - Biochemical deficiencies and the roles of certain enzymes. J. Bacteriol., 95: 1056-1062, 1968.
21. FORTNAGEL, P. The Regulation of aconitase and isocitrate dehydrogenase in sporulation mutants of Bacillus subtilis. Biochim. Biophys. Acta., 222: 290-298, 1970.
22. GALBRAITH, J.C. & J.E. SMITH. Sporulation of Aspergillus niger in submerged liquid culture. J. Gen. Microbiol., 59: 31-45, 1969.
23. GOLDIN, B.R. & C. FRIEDEN. L-Glutamate^o dehydrogenases. Currentes topics in cellular regulation., 4: 102-110, 1971.
24. GILVARG, C. & B.D. DAVIS. The role of the tricarboxylic acid cycle in acetate oxidation in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 222: 307-319, 1956.
25. GRAY, C.T., W.T. WIMPENNY, M.R. MOSSMAN. Regulation of metabolism in facultative bacteria: II-Effects of aerobiosis and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta., 117: 33-41, 1966.
26. HAAN, E.J.; J.M. TAGER, E.C. SLATER. Factors affecting the pathway of glutamate oxidation in rat-liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta., 131: 1-13, 1967.
27. HALPERN, Y.S. & H.E. UMBARGER. Utilization of L-glutamic

- and 2-oxoglutaric acid as sole sources of carbon by Escherichia coli. J.Gen. Microbiol., 26: 175-183, 1961.
28. HANSON, R.S. & D.P. COX. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of Tricarboxylic acid cycle enzymes. J. Bacteriol., 93: 1777-1787, 1967.
 29. HANSON, R.S. & N. TANAKA. Regulation of the Tricarboxylic acid cycle in gram-positive facultatively anaerobic bacilli. J. Bacteriol., 122, 215-223, 1975.
 30. HANSON, R.S., V.R. SRINIVASAN, H.O. HALVORSON. Biochemistry of sporulation. I-Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol., 85: 451-460, 1963.
 31. HANSON, R.S.; J. BLICHARSKA, M. ARNAUD, J. SZULMAJSTER. Observations on the regulation of the synthesis of the Tricarboxylic Acid Cycle enzymes in Bacillus subtilis. Marburg. Biochim. Biophys. Res. Commun., 17 (6): 690-695, 1964.
 32. HIRONO, E. Vias de utilização da glucose em Pycnoporus cinnabarinus. 1976. Tese de Mestrado. Departamento de Bioquímica da U.F.PR, 1976. 90p.
 33. HOLZER, H.; W. BERNHARDT, K. PANTEN. Gedämpftes oscillieren der synthesesgeschwindigkeit von DPN-Abhängiger glutamat dehydrogenase in hefezellen. Biochim. Biophys. Acta., 99: 531-539. 1965.
 34. HOLZER, H. & G. HIERHOLZER. Hemmung der synthese von DPN-abhängiger glutamat-dehydrogenase in hefe durch Actinomycin C. Biochim. Biophys. Acta., 77: 329-331, 1963.
 35. HORECKER, B.L. & A. KORNBERG. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., 175: 385-390, 1948.

36. HYNES, M.J. The effects of the carbon sources on Glutamate Dehydrogenase activities in Aspergillus nidulans J. Gen. Microbiol., 81: 165-170, 1974.
37. INGEBRETSEN, O.C. Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide Phosphate - Specific Isocitrate Dehydrogenase from Blastocladiella emersonni. J. Bacteriol., 124: 65-72, 1975.
38. KAPOOR, M. & A.K. GROVER. Catabolite-controlled regulation of glutamate dehydrogenases of Neurospora crassa. Can. J. Microbiol., 16: 33-40, 1970.
39. KATO, K.; S. KAIKE, K. YAMADA, M. YAMADA, S. TANAKA. Di and Triphospho pyridine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of Piricularia oryzae and their behaviors in glutamate media. Arch. of Biochem. Biophys. 98: 346-347, 1962.
40. KITTO, G.B. Intra-and Extramitochondrial Malate Dehydrogenase from Chicken and Tuna Heart. In: Methods in Enzymol. V.13. New York, Academic., 1969. p.106-122.
41. KORNBERG, H.L. The co-ordination of metabolics routes. Sympos. Soc. Gen. Microbiol., 15: 8-23, 1965.
42. KREBS, H.A.; S. GURIN, L.V. EGGLESTON. The pathway of oxidation of acetate in Baker's Yeast. Biochem. J., 51: 614-628, 1952.
43. KREBS, H.A. & KORNBERG, H.L. Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified Tricarboxylic acid cycle. Nature., 179: 988-991, 1957.
44. LOWRY, O.M., N.J. ROSENBROUCH, A.L. FARR & R.J. RANDALL. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biochem., 193: 265-275, 1951
45. LOVETT, J.S. & E.C. CANTINO. Reversible bicarbonate-induced enzyme activity and the point of no return during morphogenesis in Blastocladiella. J. Gen. Microbiol., 24: 87-93, 1961

46. MAGASANIK, B. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.,
26: 249-256. 1961. Catabolic repression.
47. MARKUS, Z.; G. MILLER, G. AVIGAD. Effect of culture conditions on the production of D-Galactose oxidase by Dactylium Dendroides. Appl. Microbiol. 13: 686-693, 1965.
48. MOSES, V. & P. SHARP. Adenosine 3':5 - cyclic monophosphate and catabolic repression in Escherichia coli. Biochem. J., 118: 481-491, 1970.
49. OCHOA, S. Crystalline condensing enzyme from pig heart. In: Methods in Enzymology. V.1. New York, Academic., 1955, p.685-694.
50. OHNÉ, M. Regulation of Aconitase synthesis in Bacillus subtilis: Induction, Feedback repression, and Catabolic Repression. J. Bacteriol., 117: 1295-1305, 1974.
51. OHNÉ, M. Regulation of the Dicarboxylic Acid part of the Citric Acid Cycle in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 122, 224-234, 1975.
52. PAIGEN, K. & B. WILLIAMS. Catabolic repression and other control mechanisms in Carbohydrate utilization. Adv. Microbiol. Physiol., 4: 251-324, 1970
53. PAPA, S.; F. PALMIERI, E. QUAGLIARIELLO. Control mechanisms of glutamate oxidation in liver mitochondria. In: Regulation of metabolic process in mitochondria., Amsterdam, Elsevier, 1966. p. 153-163.
54. PATEMAN, J.A. Regulation of synthesis of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in Micro-organisms. Biochem. J., 115: 769-775, 1969.
55. POLAKIS, E.S. & W. BARTLEY. Changes in the enzyme activities of Sacharomyces cerevisiae. during aerobic growth on different Carbon Sources. Biochem. J., 97: 284-297, 1965.

56. RACKER, A.E. Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochim. Biophys. Acta., 4: 211-214, 1950.
57. REEVES, H.C., G.O. DAUMY, C.C. LIN & M. HOUSTON. NADP+ specific Isocitrate Dehydrogenase of Escherichia coli. I-Purification and Characterization. Biochim. Biophys. Acta., 258: 27-39, 1972.
58. ROKOSH, D.A.; W.G.W. KURZ, T.A. LARUE. A modification of Isocitrate and Malate Dehydrogenase Assays for use in crude Cell free extracts. Anal. Biochem., 54: 477-483, 1973.
59. ROST, J. & S.M. RAPOPORT. The pathway of glutamate oxidation in rabbit reticulocytes. Eur. J. Biochem., 26: 106-111, 1972.
60. SANWAL, B.D. & M. LATA. The occurrence of two different glutamic dehydrogenase in Neurospora crassa. Can. J. Gen. Microbiol., 7: 319-328, 1961.
61. SANWAL, B.D. & M. LATA. Effect of glutamic acid on the formation of two glutamic acid dehydrogenase of Neurospora. Biochim Biophys. Res. Commun., 6: 404-409, 1962.
62. SANWAL, B.D. & M. LATA. Concurrent regulation of glutamic acid dehydrogenases of Neurospora. Archv. Biochim. Biophys., 97: 582-588, 1962.
63. SANWAL, B.D. Diphosphopyridine nucleotide and Triphosphopyridine nucleotide linked glutamic dehydrogenases of Fusarium. Archv. Biochim. Biophys., 93: 377-386, 1961.
64. SMITH, E.L.B.M. AUSTEN, K.M. BLUMENTHAL & J.F. NYC. Glutamate dehydrogenases. In: THE ENZYMES., 3ed. V.11. New York. Academic., p. 293-367, 1975.
65. STACHOW, C.S. & B.D. SANWAL. Regulation, Purification and some properties of the NAD specific glutamate dehydro-

- genase of Neurospora. Biochim. Biophys. Acta., 139: 294-307, 1967.
66. STEWART, G.R. & D. MOORE. The activities of glutamate Dehydrogenases during Mycelial growth and sporophore development in Coprinus lagopus (sensu Lewis). J. Gen. Microbiol., 83: 73-81, 1974.
67. THOMULKA, K.M. & A.G. MOAT. Inorganic nitrogen assimilation in Yeasts: Alteration in enzymes activities associated with changes in cultural conditions and growth phase. J. Bacteriol. 109 (1): 25-33, 1972.
68. UMBARGER, H.E. The influence of the environment on acetate metabolism in Escherichia coli. J. of Bacteriol., 68: 140-145, 1954.
69. UMBARGER, H.E. Regulation of amino-acid metabolism. Ann. Rev. Biochem., 38: 323-370, 1969.
70. ULLMANN, A. & J. MONOD. Cyclic AMP as an antagonist of catabolic repression in Escherichia coli. FEBS Lett., 2: 57-60, 1968.